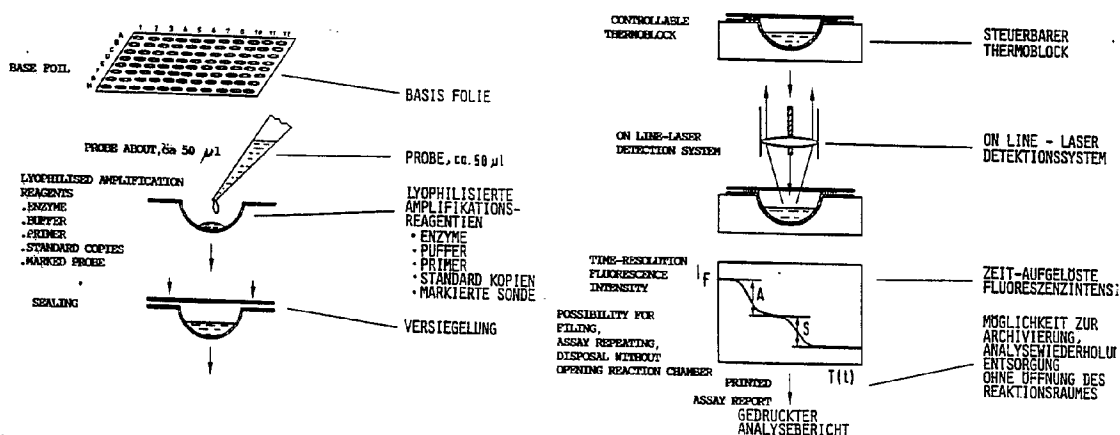


<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12Q 1/68, B29C 51/00, B01L 7/00 B29C 65/02, B65B 9/04, G05D23/19</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/16194</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1993 (19.08.93)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/00254</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 1993 (04.02.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 03 178.8 5. Februar 1992 (05.02.92) DE P 42 34 086.1 9. Oktober 1992 (09.10.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DIA-GEN INSTITUT FÜR MOLEKULAR-BIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Straße 4, D-4010 Hilden (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HENCO, Karsten [DE/DE]; Kirchberg 4, D-4006 Erkrath 2 (DE). EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-Dehio-Weg 14, D-3400 Göttingen (DE). RIESNER, Detlev [DE/DE]; Eichenwand 15, D-4000 Düsseldorf 12 (DE).</p>		
<p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw. ; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-5000 Köln 1 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>		

(54) Title: PROCESS FOR DETERMINING *IN VITRO* AMPLIFIED NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON *IN VITRO* AMPLIFIZIERTEN NUKLEINSÄUREN



(57) Abstract

A process for the qualitative and quantitative determination of at least one *in vitro* amplified nucleic acid in a closed reaction chamber. In said process there is at least one substance (probe) during or after the amplification of the nucleic acid which enters into interaction with the nucleic acid to be detected; spectroscopically measurable parameters of the substance (probe) undergo a change and thereby a measurable signal is generated; the sample to be measured is exposed to the effect of a gradient which can at least partly denature the nucleic acids; the measurable parameter which alters through the effect of the gradient is measured; and the entire amplification reaction, including the qualitative and quantitative determination, may be performed in a closed reaction chamber (measuring compartment) which does not have to be opened during the process. The method is based on a comparison of the copy number and sequence of a DNA or RNA to be analysed with an internal standard with the aid of a time-temperature gradient. Detection is performed with optical processes in homogeneous or heterogeneous phases and requires no electrophoretic separation methods. The amplified reaction process may remain closed both during and after analysis. This, for example, permits disposal by amplified reaction processes with no risk whatsoever of contamination.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von mindestens einer in vitro-amplifizierten Nukleinsäure in einem verschlossenen Reaktionsraum, wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäure mindestens eine Substanz (Sonde) vorhanden ist, die mit der nachzuweisenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt, wobei spektroskopisch messbare Parameter der Substanz (Sonde) eine Änderung erfahren und dabei ein messbares Signal erzeugt wird, die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden messbaren Parameters und die gesamte Amplifikationsreaktion einschliesslich der qualitativen und quantitativen Bestimmung in einem verschlossenen Reaktionsraum (Messkompartiment) ohne zwischenzeitliche Öffnung durchführbar ist. Die Methode basiert auf einem Vergleich der Kopienzahl und der Sequenz einer zu analysierenden DNA oder RNA und einem internen Standard mit Hilfe eines zeitlichen Temperaturgradienten. Der Nachweis wird mit optischen Verfahren in homogenen oder heterogenen Phasen geführt und erfordert keine elektrophoretischen Trenntechniken. Der amplifizierte Reaktionsansatz kann auch während und nach der Analyse verschlossen bleiben. Damit wird z.B. eine Entsorgung unter vollständiger Vermeidung der Kontaminationsgefahr durch amplifizierte Reaktionsansätze möglich.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

"Verfahren zur Bestimmung von in vitro
amplifizierten Nukleinsäuren"

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung von mindestens einer in vitro amplifizierten Nukleinsäure in einem Reaktionsraum, eine Vorrichtung, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist, sowie Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die moderne Analytik greift zunehmend auf molekularbiologische Grundprinzipien zurück. Mit der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist in jüngster Zeit ein sehr nützliches Werkzeug für die Analytik mittels molekularbiologischer Grundlagen gefunden worden, die sich auf allen Gebieten der Analytik, in denen Nukleinsäuren eine direkte oder indirekte Rolle spielen, angewendet werden kann.

Die PCR-Analytik (R.K. Saiki et al. (1988) Science 239, 487 - 491) und andere enzymatische Amplifikationstechniken (J.C. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 1874 - 1878) sind prinzipiell in der Lage, niedrige Titer von DNA- oder RNA-Kopien in einer wäßrigen Lösung nachzuweisen. Letztlich ist eine einzige Kopie ausreichend für eine enzymatische Amplifikation. Allerdings haben sich eine Reihe praktischer Schwierigkeiten bei der routinemäßigen qualitativen Anwendung herausgestellt sowie bei dem Bestreben, PCR mit einer quantitativen

- 2 -

Kopienzahl-Bestimmung zu verbinden. Die Schwierigkeiten der Amplifikationsanalytik stehen im Zusammenhang mit:

- Unerwünschter Amplifikation durch Fehlpriming,
- ungleichmäßiger Verbrauch der Primer,
- Heteroduplex-Bildung,
- schwankende Zykluseffizienzen,
- diverse Amplifikationsartefakte,
- Quantifizierungsproblematik,
- Kontaminationsgefahr,
- "falsch positive" Resultate,
- "falsch negative" Resultate,
- Testkosten,
- Serienreife,
- Aufwand in der Handhabung, verglichen mit immunologischen ELISA-Verfahren für die Proteinanalytik.

Die WO 91/02815 beschreibt einen sicheren qualitativen und quantitativen Nachweis spezifischer DNA und RNA aus biologischem Probenmaterial mit Hilfe einer DNA/RNA-Amplifikationsmethode in Kombination z. B. mit der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (siehe auch K. Henco & M. Heibey (1990) Nucleic Acids Res. 19, 6733 - 6734, J. Kang et al. (1991) Biotech Forum Europ 8, 590 - 593, G. Gilliland et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) 87, 2725 - 2729).

Mit der in der WO 91/02815 beschriebenen Amplifikationsstrategie ist es gelungen, die Sensitivität der Amplifikationstechniken mit einer sicheren und äußerst genauen Quantifizierung zu verbinden (Variation \pm 15%). Die Methode ermöglicht es, die oben genannten Probleme, wie sie sich bei Amplifikationsverfahren ergeben, zu kontrollieren bzw. zu unterdrücken. Mit der Verwendung eines nahezu idealen internen Standards definierter Kopienzahl, der sich nur in einer einzigen Basenposition von dem zu

- 3 -

bestimmenden Template unterscheidet, läßt sich eine Amplifikation unter Beibehaltung des initialen Verhältnisses von Template und Standard durchführen (K. Henco & M. Heibey ((1990) Nucleic Acids Res. 19, 6733 - 6734). Template und Standard werden nachträglich in einem Temperaturgradientenverfahren mit zeitlichem oder räumlichem Temperaturgradienten im gelelektrophoretischen System durchgeführt. Das Verhältnis von Template und Standard läßt sich einfach ermitteln, indem das Reaktionsgemisch mit einem radioaktiv markierten oder fluoreszenz-markierten Standard hybridisiert wird. Die ansonsten störend auftretende Heteroduplex-Bildung kann in diesem System das Ergebnis nicht verfälschen. Vielmehr wird die Heteroduplex-Bildung zur eigentlichen Messung herangezogen.

Übliche Probleme durch ungleichmäßigen Verbrauch der Primer, Fehlpriming-Reaktionen, Sättigungseffekte, Variationen in der Effektivität der Amplifikationen, haben keinen negativen Einfluß auf das Quantifizierungsergebnis.

Diese Technologie wurde auf wichtige analytische Fragestellungen in der Medizin angewandt. So ist es beispielsweise möglich geworden, die Cytomegalie-Infektion bzw. -Virämie bei transplantierten Patienten oder Neugeborenen quantifizierend zu erfassen. Hier hat sich das Verfahren besonders bewährt, denn angesichts einer stellenweise mehr als 90%-igen Infektionsrate in den europäischen Staaten ist der reine Nachweis von Cytomegalie-Viren nicht bedeutungsvoll, sofern nicht gleichzeitig eine Titer-Bestimmung durchgeführt wird, die den akuten Zustand einer Virämie anzeigt. Bei viralen Erkrankungen gewinnt der quantifizierende Aspekt an Bedeutung, insbesondere im Zusammenhang mit den im verstärkten Maße angewandten antiviralen Therapie-Schemata. Häufig sind antivirale Therapien, wie zum Beispiel im Falle von HIV

- 4 -

mit AZT für den Patienten systemisch äußerst belastend und als antivirales Therapeutikum nur über einen limitierten Zeitraum erfolgreich einzusetzen. Deshalb wird es für die Zukunft sehr bedeutsam sein, eine wirtschaftliche und einfache Technik zu haben, die sowohl eine Titer-Bestimmung bzw. eine Bestimmung der Virusgen-Aktivität oder einen Therapie-induzierten Drift zu resistenten Virusstämmen anzeigt.

Die bislang angewandten gelelektrophoretischen Methoden zur Auftrennung der markierten Homoduplices und Heteroduplices haben sich bei kleinen bis niedrigen Probenzahlen (10 - 20) als äußerst effizient und korrekt bezüglich der gelieferten Ergebnisse herausgestellt. Ein gravierender Nachteil ist jedoch die relativ zeit- und personalaufwendige Analysentechnik, die den Einsatz dieses sehr aussagefähigen Analyseverfahrens als generelle Diagnostik-Methode für die DNA- und RNA-Analytik erschwert. Es ist mit der Temperatur-Gelelektrophorese-Technik kaum möglich, Probenzahlen > 50 pro ausführender Person und Tag durchzuführen. Auch eine Automatisierung ist nur schwer zu erreichen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es mithin, ein Verfahren bereitzustellen, daß die oben erwähnten Nachteile der Verfahren gemäß dem Stand der Technik vermeidet, insbesondere ein Nachweisverfahren für Nukleinsäuren so auszugestalten, daß keine gelelektrophoretische Trennung erforderlich ist, um somit eine einfachere und automatisierbare Verfahrensweise zu gewährleisten. Gleichzeitig soll eine Vorrichtung geschaffen werden, die es erlaubt, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren detektierten amplifizierten Nukleinsäuren sicher und einfach zu erkennen, wobei die Vorrichtung ebenfalls eine weitestgehend automatisierbare Auswertung erlauben soll.

- 5 -

Erfindungsgemäß gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von mindestens einer in vitro-amplifizierten Nukleinsäure in einem verschlossenen Reaktionsraum,

- wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäure mindestens eine Substanz (Sonde) vorhanden ist, die mit der nachzuweisenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
- wobei spektroskopisch meßbare Parameter der Substanz (Sonde) eine Änderung erfahren und dabei ein meßbares Signal erzeugt wird,
- die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann,
- unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden meßbaren Parameters und
- die gesamte Amplifikationsreaktion einschließlich der qualitativen und quantitativen Bestimmung in einem verschlossenen Reaktionsraum (Meßkompartiment) ohne zwischenzeitliche Öffnung durchführbar ist.

Die Substanz (Sonde), deren Parameter spektroskopisch meßbar sein soll, enthält vorzugsweise mindestens einen fluoreszierenden Rest, vorzugsweise mit interkalierenden Eigenschaften und einen Nukleinsäureanteil. Die Wechselwirkung mit den in vitro amplifizierten Nukleinsäuren in Abhängigkeit des Denaturierungszustandes geht einher mit einer Änderung des spektroskopischen Meßsignals. Dies kann beispielsweise durch Interkalation des Farbstoffes in die Nukleinsäuredoppelhelix oder durch Verdünnungs- oder Konzentrierungseffekte im Meßkompartiment erfolgen.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der durch den Gradienten ausgelöste Denaturierungsprozeß der Nukleinsäure über eine Änderung der Wellenlänge und/oder eine Fluoreszenz-

- 6 -

intensität-Shift und/oder eine Änderung der Lebenszeit eines angeregten Zustands oder über das Prinzip des sogenannten Energy Transfers (Förster Transfer) oder über einen Konzentrationseffekt erfaßt oder über unterschiedliche, vorzugsweise hydrophobe Wechselwirkungseigenschaften der markierten Sonde.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch eine simultane oder sequenzielle Erfassung mehrerer verschiedener amplifizierter Nukleinsäuren. Dies erfolgt dadurch, daß mehrere spektroskopisch voneinander unterscheidbare Farbstoffe eingesetzt werden, mit denen sich die verschiedenen amplifizierten Nukleinsäuren analysieren lassen und/oder über die mindestens eine unabhängige Eichsubstanz eingeführt wird. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn die verschiedenen Nukleinsäuren, die analysiert werden sollen mit unterschiedlich markierten Hybridisierungspartnern in Wechselwirkung treten.

Die Aufnahme des Meßsignals erfolgt beispielsweise durch Messung der von den Farbstoffen ausgehenden Fluoreszenz, welche insbesondere durch einen Laser kontinuierlich oder getaktet angeregt werden können.

Eine weitere bevorzugte Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht darauf, daß die amplifizierten Nukleinsäuren mindestens einen koamplifizierten Nukleinsäurestandard enthalten, dessen Sequenz zu einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch ist, mit Ausnahme jedoch mindestens einer Punktmutation, die insbesondere in einem Sequenzbereich niedrigster Stabilität liegt. Es ist jedoch darauf zu achten, daß diese Punktmutation außerhalb der Primer-Bindungsstellen liegt, wenn enzymatische Amplifikationen durchgeführt werden. Der Nukleinsäurestandard kann ebenfalls ein natürlicher Bestandteil der zu analysierenden Nukleinsäure sein.

- 7 -

Erfindungsgemäß ist es auch möglich, eine erfolgreiche Amplifizierung einer bestimmten Nukleinsäure zu beobachten, ohne nach erfolgter Amplifikation ein markiertes Standardfragment dem Reaktionsansatz zuzufügen. Bei dieser bevorzugten erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden insbesondere die zur Amplifikation erforderlichen Primer eingesetzt (EP-A-0 469 755). Diese hybridisieren dann an den entsprechenden Stellen in der Sequenz der betreffenden Nukleinsäuren. Die entsprechenden Sequenzen können zwischen den Primerstellen jedoch so unterschiedlich sein, daß beim Durchlaufen des Temperaturgradienten beide Sequenzen, die amplifizierte Test- und Standardsequenz, voneinander getrennt denaturieren und vorzugsweise dabei kooperativ denaturieren.

Dadurch wird eine Verwendung solcher Sequenzen ermöglicht, die eine derart große Sequenzabweichung aufweisen, daß eine Heteroduplexbildung nicht mehr erfolgen kann. Damit entfällt auch die Notwendigkeit, nach der erfolgten Amplifikation ein markiertes Standardfragment zusetzen zu müssen. Ein unterschiedlicher Schmelzpunkt beider Sequenzen läßt sich beispielsweise durch starke Längenvariation der Sequenz oder durch die Wahl einer Poly-A/T-Sequenz beeinflussen. Die Frage, ob eine Amplifikationsreaktion stattgefunden hat, läßt sich dann durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, zum Beispiel in einem Temperaturgradienten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ethidiumbromid entscheiden, wobei auch eine quantitative Erfassung ermöglicht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Durchführung der Amplifikation in homogener Phase oder an fester Phase, vorzugsweise mit einem an eine feste Phase gekoppelten Primer, an dessen verlängerter Sequenz die markierte Sonde hybridisieren kann. Die Konzentration der Sonde kann somit entweder gezielt auf dem Festphasenträger oder in der freien Lösung bestimmt werden.

- 8 -

Vorzugsweise wird mindestens ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül an ein Nukleinsäuremolekül gekoppelt, dessen Sequenz identisch oder homolog mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder dem koamplifizierten Nukleinsäurestandard ist.

Wenn das Nukleinsäuremolekül mit dem daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Amplifikation zugesetzt wird, erfolgt die Hybridisierung mit den amplifizierten Nukleinsäuren, vorzugsweise durch einen thermischen Denaturierungsschritt mit nachfolgendem Renaturierungsschritt. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich, daß das Nukleinsäuremolekül mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff dem Reaktionsgemisch vor erfolgter Amplifikation zugesetzt wird. Dabei ist die Sonde als nicht amplifizierbare Doppelstrang-RNA oder als nicht amplifizierbare chemisch modifizierte Nukleinsäure zuzusetzen.

Zur Amplifikation der Nukleinsäure wird in einer möglichen Ausführungsform ein Primer des zur Amplifikation eingesetzten Primerpaares verwendet, welcher 5'-terminal eine G:C-reiche Region enthält von beispielsweise 15 bis 20 G:C-Resten.

Die bislang beschriebene Standardisierung und Quantifizierung des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die vorstehend bevorzugten Ausführungsformen der beispielsweise fluoreszierenden Sonden ist mit einer tragbaren Einschränkung behaftet. So dürfen die zur Standardisierung verwendeten Sonden erst nach erfolgter Amplifikation zugesetzt werden. Dies bedeutet, daß sie zunächst während der Amplifikationsreaktion räumlich vom Amplifikationsgeschehen getrennt aufzubewahren sind. Ebenso kann es für verschiedene Anwendungen vorteilhaft sein, Sonden zur Verfügung zu stellen, die als Standardnukleinsäuren verwendet werden und in mehr als einer Position von der

- 9 -

zu bestimmenden Nukleinsäure abweichen. Um das Signal-Rausch-Verhältnis bei der späteren Bestimmung mit Hilfe der eingesetzten Sonde zu verbessern, ist es wünschenswert, die Sonde nicht im Unterschuß dem zu amplifizierenden Gemisch zusetzen zu müssen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher als Sonde ein Oligo- oder Polynukleotid als Einzelstrangnukleinsäure zugesetzt, welche durch chemische Modifizierung aber nicht an der Amplifizierungsreaktion teilnehmen kann. Erst durch geeignete Manipulationen wird nach der Amplifizierungsreaktion die einzelsträngige Sonde freigelegt und kann dann mit den entsprechenden zu bestimmenden Nukleinsäuren hybridisieren. So kann beispielsweise die Sonde, wenn sie in Form einzelsträngiger Nukleinsäure vorliegt, in Form einer "Haarnadelstruktur" inaktiviert werden und somit an der Teilnahme an der Amplifikationsreaktion gehindert werden.

Die als Sonden in besonders bevorzugter Weise zu verwendenden Oligo- oder Polynukleotide weisen ein oder mehrere Strukturelemente mit mindestens zwei chemischen Substituenten auf, die jeweils in der Lage sind, mit elektromagnetischen Wellen unter Lösen oder Knüpfen dauerhafter Bindungen oder durch Absorption und/ oder Emission von Strahlung in Wechselwirkung zu treten. Als Substituent, der besonders geeignet ist, unter Knüpfen und Lösen von dauerhaften Bindungen, insbesondere kovalenten Bindungen, mit elektromagnetischer Strahlung in Wechselwirkung zu treten, hat sich Psoralen oder dessen Derivate bewährt. Als Strukturelemente, die als eigentliche Marker der Sonde dienen, haben sich insbesondere Lumineszenzfarbstoffe, wie Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher Quantenausbeute bewährt, wie die Farbstoffe der Thiazolorange-Familie. Farbstoffe mit großen Stoke-Ver-

- 10 -

schiebungen sind bevorzugt, die in Abhängigkeit vom Hybridisierungszustand die Lumineszenzeigenschaften ändern.

Es kann vorteilhaft sein, daß die Spektren der Strukturelemente an den jeweiligen sensitiven Stellen, die einerseits zum Lösen und Knüpfen von beispielsweise kovalenten Bindungen anzuregen sind, oder andererseits als Absorptions- oder Emissionsmaximum anzusehen sind, so weit auseinanderliegen, daß eine jeweilige Anregung die Funktion des anderen Strukturelementes nicht stört.

Es ist ebenfalls möglich, die beiden chemischen Strukturelemente in einer einzigen chemischen Struktur zu vereinen, sofern das Knüpfen und Lösen von Bindungen jeweils bei anderen Wellenlängen erfolgt, wie eine mögliche maximale Fluoreszenz dieser Struktur. So können die jeweiligen Funktionen, zum einen die Fixierung der Sonde in einer nicht amplifizierten Struktur und zum anderen die spektroskopische Identifizierung dieser Struktur, nicht miteinander interferieren.

Sofern zwei getrennte Strukturelemente die getrennten Funktionen wahrnehmen hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß deren Abstand von mindestens 10 Nukleotiden auf dem Oligo- oder Polynukleotidstrang nicht unterschreiten sollten.

Die bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung der erfindungsgemäßen Oligo- und/oder Polynukleotide funktioniert vorzugsweise so, daß die Sonden dem bereits oben beschriebenen Gemisch von Substanzen zugefügt werden, die Amplifikationsreaktion wie beschrieben durchgeführt wird und danach beispielsweise durch Strahlung induziert, die verkappte Sonde freigesetzt wird, um dann mit dem zu bestimmenden Am-

- 11 -

plifikationsprodukt zu hybridisieren und wie beschrieben beispielsweise durch einen zeitlichen Temperaturgradienten in homogener Lösung, durch Temperaturgelelektrophorese oder einen chromatographischen Verfahren detektiert zu werden.

Mit dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird es möglich, die Analyse so durchzuführen, daß die markierte Hybridisierungssonde nicht mehr innerhalb des Kompartimentes des Reaktionsraumes separat angeordnet sein muß, um sie dem Reaktionsgemisch erst unmittelbar vor der eigentlichen Analyse zuzusetzen. Es ist somit möglich, die markierte Sonde mit den übrigen Reagenzien in einer Form vorzulegen, in der sie selbst nicht am nachfolgenden Amplifikationsprozeß teilnehmen kann. Dadurch wird eine Trennung des Amplifikationsgemisches und der Sonde innerhalb des Meßraumes vermeidbar.

Zur Durchführung des Verfahrens werden vorzugsweise folienartige Systeme mit Vertiefungen oder Ausbuchtungen, die als Reaktionsräume (Kompartimente) dienen, verwendet. Die Foliensysteme sind vorzugsweise thermisch verschweißbar und zur Aufnahme verwendungsfertiger Reagenziengemische in gefriergetrockneter oder matrixgebundener Form geeignet. Weiterhin ist eine direkte optische Vermessung des Inhalts der Reaktionsräume möglich. Das Folienmaterial ist also zumindest für bestimmte Wellenlängenbereiche elektromagnetischer Strahlung durchlässig bzw. transparent. Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigten Reagenzien werden vorzugsweise in räumlich abgetrennten Matrices gelagert und nach dem Schließen eines Reaktionsraumes zeitlich getrennt dem Reaktionsgeschehen zugeführt. Vorzugsweise sind die Reaktionsräume im Abstand der Löcher handelsüblicher Mikrotiterplatten voneinander getrennt. Dies hat insbesondere den Vorteil, daß Geräte, die zur Bearbeitung

- 12 -

von Mikrotitrationsplatten geeignet sind, in der erfindungsgemäß beschriebenen Technologie eingesetzt werden können.

Zur Analyse eines amplifizierten Nukleinsäuregemisches wird nach Zugabe der zur Reaktion benötigten Substanzen vorzugsweise ein zeitlich gesteuerter Temperaturgradient angelegt und das Denaturierungsverhalten der Nukleinsäuren gemessen. Dies erfolgt durch die Änderung der spektroskopischen Parameter der mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tretenden Substanz. Die Änderung des spektroskopischen Parameters wird zeitlich oder in äquivalenter Weise, in Abhängigkeit der Temperaturänderung verfolgt.

Die Auswertung der Funktion der Änderung des spektroskopischen Verhaltens der mit der Nukleinsäure in Wechselwirkung tretenden Substanz erlaubt dann den Schluß auf Anwesenheit oder Anzahl oder Homologie einer gesuchten Nukleinsäure zum korrespondierenden Standard. Die Auswertung der Daten erfolgt vorzugsweise on line durch eine Datenverarbeitungsanlage.

Vorteilhaft am erfindungsgemäßen Verfahren äußert sich neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik, daß die Amplifizierung der Nukleinsäuren und die spätere Analytik in einem einzigen hermetisch verschlossenen Reaktionskompartiment durchgeführt werden kann. Dadurch wird eine Entsorgung dieser biologischen Stoffe ohne Öffnung der Kompartimente möglich und eine potentielle Kontaminationsquelle ausgeschaltet. Desweiteren ermöglicht diese Vorgehensweise die Lagerung von Testfolien der oben genannten Art im geschlossenen Zustand auch über längere Zeiträume, so daß eine Archivierung der oftmals wertvollen Testsubstanzen möglich wird. Die Lagerung erfolgt aber vorzugsweise im gefrorenen Zustand. Das erfindungsgemäße Verfahren ermög-

- 13 -

licht ebenfalls in vorteilhafter Weise, daß die Versuche gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt auch nach längerer Zwischenlagerung wiederholbar sind, oder das amplifizierte Gemisch danach präparativ aufarbeitbar und analysierbar ist.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens weist eine Einrichtung zur zeitabhängigen Thermostatisierung der im Verfahren zu verwendenden Reaktionsräume auf. Vorzugsweise wird die Thermostatisierung durch eine programmierbare Einheit gesteuert. Die Ableseeinrichtung der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht vorzugsweise aus einer optischen Einheit, die in der Lage ist, Photonen zu registrieren. Besonders bevorzugt sind solche Einheiten, die zur Registrierung emittierten Fluoreszenzlichts geeignet sind. Ebenfalls in Betracht kommen Geräte, die in der Lage sind, andere spektroskopische Eigenschaften, wie Kernspin oder Elektronenspin etc., die mit der Änderung der Konformation der Nukleinsäure-Doppelhelix oder anderen Strukturvariablen korrelierbar sind, oder chromatographische Verfahren einzusetzen. Mit der Methode der Chromatographie hydrophober Wechselwirkungen lassen sich Moleküle mit hydrophoben Liganden, wie sie partiell denaturierende Strukturen der zu analysierenden Substanzen darstellen, von den Dublices abtrennen.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in der Lage, ein Mittel zur Durchführung des Verfahrens aufzunehmen, das aus einem System von Reaktionskompartimenten, vorzugsweise aus einem Folien-system mit gebrauchsfertigen Reagenzien in gefriergetrockneter Form aufgebaut ist. Die Reaktionskompartimente sind vorzugsweise im Mikrotitrationsformat angeordnet. Die Reagenzien des Mittels zur Durchführung des Verfahrens sind vorzugsweise in mindestens einer wasserlöslichen

- 14 -

Matrix fixiert und/oder gelagert. Die Matrix enthält vorzugsweise Stabilisatoren, wie Zucker, insbesondere Trehalose oder Saccharose. Bevorzugt enthält das Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens Reaktionskompartimente und/oder weitere Reagenzienreservoir, Amplifikationsprimer, Pufferbestandteile sowie mindestens eine Polymerase und übliche Kofaktoren zur Durchführung der Amplifikationsreaktion. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Mittels zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Reaktionsraum bzw. das Reaktionskompartiment mit einem weiteren abgetrennten Reagenzienreservoir in einer Matrix versehen, die sich in der das Kompartiment verschließenden Folie befindet. Dabei wird vorzugsweise die markierte Sonde mit den für die Hybridisierung notwendigen Puffersubstanzen gelagert.

Das Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorzugsweise in Kit-Systemen zusammengestellt, das Reaktionsgefäße, wie Foliensysteme mit lagerfähigen und direkt einsetzbaren Reagenziengemischen beinhaltet, wobei die Reaktionsgefäße nur mit der zu analysierenden Probe beschickt werden müssen, um dann im hermetisch versiegelten Zustand einem Amplifikationsverfahren und anschließender Analyse unterworfen zu werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Analyse von Stoffgemischen, vorzugsweise Nukleinsäuren, in denen mindestens eine Komponente im Temperaturbereich des zeitlichen Temperaturgradienten eine thermische Umwandlung erfährt. Durch Hinzufügen und Koamplifikation eines Standards mit genau bekannter Kopienzahl ist das erfindungsgemäße Verfahren standardisierbar und erlaubt quantitative Aussagen über die amplifizierten Nukleinsäuren der zu untersuchenden Probe. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich zum Beispiel Mu-

- 15 -

tationen, Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Umstellungen in der DNA/RNA-Nukleinsäure feststellen. Mit der quantitativen Analyse läßt sich auch die Konzentration dieser Änderungen in der Nukleinsäure ermitteln. Die Proben können aus unterschiedlichstem Material stammen, wie lebendem, totem, fossilem und in vivo nicht mehr stoffwechselaktivem Gewebe oder aus Körperflüssigkeiten, aus in vitro Zellkulturen oder aus Proben der Umwelt. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die qualitative und quantitative Erfassung zellulärer Gene und Gene infektiöser Krankheitserreger direkt oder über ihre RNA-Genprodukte als Wildtypsequenz oder als Varianten.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich aber auch zur Untersuchung und Bestimmung von potentiell toxischen Substanzen oder potentiell pharmazeutischen Wirkstoffen oder chemischen oder biologischen Pflanzenschutzmitteln einsetzen, indem deren Einfluß auf Nukleinsäuren oder deren Amplifikation in zellulären oder nicht zellulären Systemen untersucht werden.

Figur 1

Die Figur 1 beschreibt schematisch einen bevorzugten Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens. In einer Vorlage von Reaktionskompartimenten in Format einer Platte für die Mikrotitration befinden sich die für eine spezifische Amplifikation einer Nukleinsäure notwendigen Reagenzien, zum Beispiel in lyophilisierter Form inklusive der Sonde. Lediglich die zu analysierende Probe wird beispielsweise in wäßrig-gelöster Form vor der Amplifikationsreaktion zugesetzt. Es wird eine homogene Lösung hergestellt.

Danach werden die Reaktionskompartimente mit einer zweiten Folie verschlossen, wobei die zweite Folie mindestens

- 16 -

eine weitere Matrix enthält mit Reagenzien, die nicht an der eigentlichen Amplifikationsreaktion teilnehmen sollen. Die Folie wird in einem Thermostatierblock positioniert, um die enzymatische Amplifikationsreaktion durchzuführen. Hierbei können sowohl Amplifikationen bei homogener Temperatur als auch in zyklisch variierenden Temperaturabläufen (PCR) ausgeführt werden. Nach erfolgter Amplifikation wird das Reaktionsgemisch mit dem zweiten Reagenzienreservoir in Kontakt gebracht und eine homogene Lösung hergestellt. Nach Durchführen eines Denaturierungs-/Renaturierungsprozesses registriert ein optisches Detektionssystem die laserangeregte Lumineszenz (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) in Abhängigkeit eines linearen Temperaturgradienten, der über den Thermoblock zeitlich gesteuert wird. Der steigende Temperaturgradient kann in einem weiten Bereich variiert werden. Die Anfangstemperatur kann z. B. minimal 5°C, die Endtemperatur maximal 100 °C betragen.

Figur 2

Die Darstellung zeigt in schematischer Form den Verlauf des erfindungsgemäßen Verfahrens am Beispiel interkalierender Farbstoffe auf molekularer Ebene, die nicht an eine Nukleinsäuresonde fixiert sind (z.B. Ethidiumbromid oder Thiazolorange-Farbstoffe). Diese Farbstoffmoleküle lagern sich unter nativen Bedingungen zwischen benachbarte Basenpaare in doppelsträngiger DNA oder RNA ein. Im interkalierten Zustand erhöht sich die Fluoreszenzausbeute bis zum 20-fachen und die Lebensdauer des angeregten Zustandes etwa um das 10-fache. Wird dieses System einem thermischen Gradienten unterworfen, so beginnen zunächst die thermodynamisch instabilsten Bereiche der Nukleinsäurehelix zu denaturieren. Eine Fehlpaarung, wie sie bei der Heteroduplexbildung erzeugt wird, destabilisiert den entsprechenden Sequenzbereich

- 17 -

und führt zu dessen frühzeitiger Öffnung. Die in diesem Bereich zunächst gebundenen Farbstoffmoleküle werden freigesetzt, wodurch sich eine Erniedrigung des Gesamtfluoreszenzsignals ergibt. Dabei ist die Farbstoffkonzentration so zu wählen, daß freier Farbstoff und gebundener Farbstoff im thermodynamischen Gleichgewicht stehen und der freie Farbstoff in deutlichem Überschuß vorliegt. Erst bei höheren Temperaturen öffnet sich der entsprechende Sequenzbereich des Homoduplex, wodurch eine weitere stufenweise Erniedrigung des Fluoreszenzsignals erfolgt. Aus dem Verhältnis der Intensitäten beider Stufen lassen sich die relativen Mengenverhältnisse von Homoduplex und Heteroduplex ermitteln.

Figur 3a und 3b

Die Figur 3a zeigt das Design eines Standards bzw. einer fluoreszenzmarkierten Sonde in einer bevorzugten Ausführungsform. Der Standard soll sich in mindestens einer Basenposition von der nachzuweisenden Nukleinsäure unterscheiden. Diese Mutation befindet sich vorzugsweise in dem Sequenzbereich niedrigster thermodynamischer Stabilität und kann leicht unter Verwendung des Primers P3 eingeführt werden. Die Mutation soll sich jedoch außerhalb der Primer-Bindungsstellen von P1 und P2 befinden. Ein Primer (P2) kann 5'-terminal eine GC-reiche Region enthalten, während der andere Primer (P1) vorzugsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff über einen Spacer chemisch gekoppelt ist, wobei der Fluoreszenzfarbstoff im Bereich der Doppelhelix interkalieren kann. Das Anwendungsprinzip der fluoreszenzmarkierten Sonde ist in Figur 3b schematisiert dargestellt.

Figur 4

in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Primer eingesetzt, wie beschrieben in:

- 18 -

Thuong, N.T. & Chassignol, M. (1987) Tetrahedron Letters 28, 4157-4160; Thuong, N.T. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 5129-5133; Helene, C. in DNA-Ligand Interactions (1987) Plenum Publishing Corporation, 127-140, W. Gushelbauer & W. Saenger Ed. Sie sind bereits teilweise kommerziell erhältlich (Appligene, Straßburg, Frankreich) Er enthält einen Spacer-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, der interkalationsfähig ist, wenn sich der Primer in einem doppelhelikalen Bereich befindet. Wird die Doppelhelix thermisch denaturiert, so ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes.

Figur 5

Die Figur zeigt schematisch eine bevorzugte Herstellung der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren Sonden, die modifiziert sind und nicht an der Amplifikationsreaktion teilnehmen.

Die europäischen Patentanmeldungen EP 469 755 und EP 379 369 beschreiben die Erzeugung von Nukleinsäurestrukturen. Dort wird beispielhaft eine Struktur erzeugt, deren Enden zueinander komplementär sind. Hierfür kommen zunächst die Primer p1 und (p1) zum Einsatz. Zur Herstellung der Sonden wird aus dem entsprechenden Amplifikat des Standards mit einem Primer p1, der das Strukturelement, welches dauerhafte Bindungen zu knüpfen vermag ("chemische Klammer"), ein Amplifikat hergestellt.

p1 wird vorzugsweise so gewählt, daß auf der 3'-Seite eine Restriktionsschnittstelle mit einem 5'-überhängenden Ende entsteht. Somit entsteht nach Restriktionsschnitt eine Struktur, die mit Nukleotiden aufgefüllt werden kann, welche ihrerseits beispielsweise einen Chromophor tragen, der der eigentliche Marker der Sonde ist. Da nach diesem Herstellungsverfahren beide Stränge den Farbstoff-

- 19 -

label und die "chemische Klammer" enthalten, wird eine Strangtrennung und Isolierung erforderlich. Dies verursacht jedoch keine Probleme und kann beispielsweise mit einer präparativen Hochdruckflüssigkeitschromatographie erfolgen.

Die chemische Verknüpfung der komplementärhybridisierenden Enden der Einzelstrang-Haarnadelstruktur wird danach photochemisch oder chemisch induziert und verhindert somit die Template-Aktivität dieser Sonde während der enzymatischen Amplifikationsphase, wie sie in Figur 5 ebenfalls dargestellt ist. Die in Form eines Haarnadel-Loops vorliegende Sonde kann aufgrund ihrer verkappten Struktur in die Amplifikation nicht mit einbezogen werden. Nach erfolgter Amplifikation kann beispielsweise bei Verwendung von Psoralenderivaten als "chemische Klammer" im kurzwelligen UV-Bereich die Verklammerung wieder gelöst werden. So wird der Sondeneinzelstrang im Denaturierungs-/Renaturierungsprozeß wieder freigesetzt und kann durch wiederholte Bestrahlung bei 360 nm, sofern Psoralenderivate verwendet werden, wieder verknüpft werden. Dieser Zusammenhang ist in Figur 6 schematisch dargestellt.

Wenn die chemische Verknüpfung mit dem Gegenstrang wiederum durch Strahlung induziert werden kann, kommt dieser chemischen Verknüpfung eine weitere vorteilhafte Funktion zu. Sie kann die Aufgabe der zuvor eingesetzten G/C-Klammern übernehmen und somit dafür sorgen, daß hybridisierte Stränge sich während der Analyse nicht mehr trennen können und somit eine irreversible Denaturierung ermöglicht wird. Wie bereits erwähnt, werden vorzugsweise als "chemische Klammern" Verbindungen mit Psoralengrundstruktur eingesetzt, welche die Eigenschaft besitzen, nach Aktivierung mit Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm mit Pyrimidinbasen kovalent zu reagieren. Die Voraus-

- 20 -

setzung ist allerdings, daß die Pyrimidinbasen um eine Basenposition versetzt auf dem gegenüberliegenden Strang positioniert sind (J. E. Hearst (1988). An. Rev. Phys. Chem., 39, 291 bis 315).

Eine andere Alternative zur Synthese der erfindungsgemäß zu bevorzugenden Sonde ist in Figur 7 gezeigt. Dabei wird die "chemische Klammer" über den Primer (p1) eingeführt. Somit trägt später lediglich der gewünschte Strang den chemischen Vernetzer. Durch den Vernetzer, der insbesondere photochemisch aktivierbar ist, wird in vorteilhafter Weise die benachbarte Schnittstelle des Restriktions-enzym R1 inaktiviert. Auf diese Weise ist dafür Sorge getragen, daß anschließend der Farbstoff, der die eigentliche Markierung der Sonde besorgt, nur auf dem gewünschten Strang eingebaut wird. Ungünstig im Vergleich zur oben beschriebenen Sondenkonstruktion ist hier der etwas längere Primer (p1) mit Modifikation.

Eine dritte mögliche, bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonde ist erhältlich durch den Einsatz einer einzelsträngigen Sonde, die ebenfalls einen quervernetzenden Liganden besitzt, dessen Position sich allerdings am 3'-Ende der Sonde befindet, während das Farbstoffmarkierungsmolekül am 5'-Ende eingebaut ist. Diese Situation wird in Figur 8 veranschaulicht. Die Sonde wird in diesem Falle so konstruiert, daß am 3'-Ende die Primerbindestelle fehlt, das 5'-Ende identisch mit der p1-Primersequenz ist, das 3'-Ende enzymatisch nicht verlängert werden kann und zwar dadurch, daß beispielsweise endständig ein Didesoxynukleotid eingebaut wird. Das quervernetzende Reagenz trennt räumlich die homologe Doppelstrangregion mit dem Markierungsstrukturelement von der diese nicht tragende Einzelstrangregion der Hybride. Wenn die Einzelstrangregion als Folge eines fehlerhaften Amplifikationsprozesses nicht einheitlich synthetisiert wird, ist dies für das Ergebnis der Sondenkonstruktion nicht beeinträchtigend.

- 21 -

Bei Verfolgung dieser Strategie der Sondenkonstruktion nimmt die Sonde deshalb nicht am Amplifikationsgeschehen teil, weil sie am 3'-Ende nicht verlängerbar ist, und somit selbst bei intermediär erfolgter Hybridisierung mit amplifiziertem Gegenstrang keine elongierte Primer-Bindungsstelle enzymatisch synthetisiert wird.

Nach erfolgter Amplifikation muß der vernetzende Ligand somit nicht zunächst aus einer vernetzten Struktur durch Bestrahlung herausgelöst werden um nachfolgend in der rehybridisierten Struktur mit Amplifikat wiederum vernetzt zu werden; es reicht ein einmaliger Bestrahlungsvorgang, um die Vernetzung mit dem Amplifikat zu bewirken.

Figur 9

Die Figuren 9a - 9e zeigen schematisch mögliche experimentelle Resultate, die mit der erfindungsgemäßen Technik erhalten werden können. Auf der Ordinate ist das Fluoreszenzsignal 1 bezogen auf die jeweilige Intensität (10) bei der niedrigsten experimentellen Temperatur (nativ) aufgetragen. Die X-Achse beschreibt den Temperaturverlauf des Aufheizvorgangs, der vorzugsweise zeitlich linear verläuft. Die zwei gestrichelten Linien markieren die Position des Standard Homoduplex (2) sowie die Position des aus markierter Sonde und zu erwartender Wildtyp-Sequenz (1) bestehenden Heteroduplex 1. Trägt die zu analysierende Sequenz mindestens eine weitere Mutation, so ergibt sich ein stufenweises Absinken des Fluoreszenzsignals bereits bei tieferer Temperatur, die für die Mutation charakteristisch ist (B3). Die relative Höhe der Stufen zueinander (1/2, 3/4, 6/7/8) gibt direkt das Verhältnis der relativen Konzentration der beteiligten Moleküle wieder. Ein Ergebnis gemäß Abbildung C wird erhalten, wenn lediglich die Standard-Nukleinsäure ampli-

fiziert wird und die biologische Probe keine oder nur geringe Mengen der entsprechenden Nukleinsäure enthält. Ein Ergebnis gemäß D6 wird erhalten, wenn die Amplifikationsreaktion nicht ordnungsgemäß abgelaufen ist und nicht einmal der Standard amplifiziert worden ist. Enthält die biologische Probe mehr als eine homologe Nukleinsäurespezies so ergeben sich mehrere voneinander unterschiedliche Stufen des temperaturabhängigen Fluoreszenzverlaufes (6 und 7).

Figur 10

Die Figur 10 beschreibt den schematischen Temperaturverlauf und die zugehörigen Einzelschritte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Im oberen Teil der Figur ist der Ablauf der Analyse mit der PCR Technik dargestellt, im unteren Teil der Figur der Verlauf bei einer Amplifikation bei homogener Temperatur (37°C), z. B. bei der 3SR-Technik (siehe unten).

- 1) Zusatz der biologischen Probe zum lyophilisierten Amplifikationsansatz und Verschweißen des Reaktionskompartimentes.
- 2) Amplifikation bei homogener Temperatur oder mit Temperaturprogrammen (PCR).
- 3) Zumischen der markierten Sonde(n) im Hybridisierungspuffer.
- 4) Denaturierungsschritt bei 98°C.
- 5) Sondenreassoziaton mit der amplifizierten DNA.
- 6) Zeitlicher Temperaturgradient mit optischer On-Line-Kontrolle.

Figur 11

Die Figur 11 zeigt schematisch eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens für die automati-

- 23 -

sierte Analyse von Großserien. Zum Testkit gehören die Folienbestandteile mit den lagerfähigen und gebrauchsfertigen Reagenzien. Die Balkenkodierung erlaubt eine Definition des Assay-Typs sowie der Belegung der Positionen. Der beschreibbare Magnetstreifen steht dann den Proben-spezifischen Daten zur Verfügung. Die Testfolien können nach der Analyse ohne Öffnen entsorgt oder für eventuelle weitere Analysen archiviert werden.

Figur 12

Die schematische Darstellung erläutert eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein zur Amplifikation verwendeter Primer ist oberflächenfixiert, z.B. an magnetischen Partikeln (magneto beads). Magneto beads lassen sich zu Zwecken der Amplifikation und Hybridisierung mit Hilfe eines Magnetfeldes in Form einer Suspension halten, zum Zwecke der Laser-Fluoreszenz-Beobachtung während des Temperaturgradienten-induzierten Dissoziationsprozesses jedoch der Lösung entziehen und an einem definierten Ort fixieren. So läßt sich der Laserstrahl direkt auf die Partikeloberfläche richten und gezielt die Fluoreszenz beim Abdissoziieren der Sonde verfolgen. Dieser Prozess gelingt z. B. bei Verwendung einer einzigen Schmelzdomäne und ermöglicht den Einsatz oligomerer, nicht-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe als optische Marker.

Reaktion und Analyse können in einem einzigen Reaktionskompartiment durchgeführt werden. Vorzugsweise wird ein Mikrotiter-Format gewählt, das es erlaubt, simultan 96 Proben oder Anteile von 96 Proben (8er oder 16er Strips) einer Analytik zu unterziehen. Das Reaktionsgefäß ist so konstruiert, daß es vorzugsweise Volumina von 20 - 100 μ l

- 24 -

trägt. Anstelle einzelner Reaktionsgefäße werden vorzugsweise Folien verwendet, die Vertiefungen oder Ausbuchtungen aufweisen, in denen die Proben aufgenommen werden. An sich bekannte Folien (PCT/EP 89/01320, PCT/EP 89/01387, PCT/DE 91/0082, PCT/DE 91/00081, PCT/DE 91/00083), eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere, da sie besonders effizient thermostatisierbar sind, billig in der Herstellung und problemlos in der umweltverträglichen Entsorgung. Die Verwendung optisch klarer Folien für den Bereich des sichtbaren Lichtes erlaubt eine On-Line-Registrierung von Fluoreszenz-Signalen handelsüblicher Fluoreszenz-Farbstoffe.

Die Folien lassen sich mit den allgemein benötigten Reagenzien befüllen (Enzyme, Primer, Puffer, Stabilisatoren etc.) und im lyophilisierten Zustand über lange Zeiträume konservieren. Als Stabilisatoren werden vorzugsweise Trehalose oder Saccharose eingesetzt. Die seriell angeordneten Reaktionsgefäße lassen sich nach Hinzufügen der zu analysierenden Proben hermetisch verschließen. Dieses kann durch Verschmelzen einer Deckfolie mit der Reaktionskompartiment-tragenden Folie geschehen. Es lassen sich auch solche Folien verwerten, die mit einem thermoplastischen Polymer beschichtet sind und sich unterhalb der Schmelztemperatur der eigentlichen Trägerfolien verschweißen lassen. Im Deckelbereich der Trägerfolie, oberhalb der Reaktionskompartimente, lassen sich Reagenzien fixieren oder kompartimentieren, die nicht von Anfang an am Reaktionsgeschehen teilnehmen sollen. Dies ist im erfindungsgemäßen Falle z. B. die spezifisch markierte Sonde, die in einem Puffergemisch lyophilisiert und stabilisiert wird, das nach erfolgter Amplifikationsreaktion für die Hybridisierung vom Amplifikationsprodukt und markierter Sonde benötigt wird. Nach Verschweißen der Reaktionskompartimente findet die Amplifikationsreaktion bei homogener Temperatur (3 SR, Self-sustained Sequence

- 25 -

Replication; TAS, Transcription based amplification system) (J.C. Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 1874-1878; Kwok, D.Y., Davis, G.R., Whitfield, K.M., Chappelle, H.L., Dimichele, L.J. & Gingeras, T.R. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177) oder im Thermocycler als Polymerase-Kettenreaktion (PCR) statt. In diesem Schritt werden Standard und Template im konstanten Verhältnis amplifiziert, so daß das Reaktionsendprodukt ca. 100 ng bis 1 µg amplifizierte Nukleinsäure enthält.

In einer möglichen, technisch sehr einfachen Ausführungsform (Figur 2), befindet sich im Reaktionskompartiment ein gelöster Lumineszenz-, vorzugsweise ein Fluoreszenzfarbstoff, vorzugsweise mit interkalierenden Eigenschaften (siehe unten), der an mehreren Positionen in doppelhelikalen Strukturen bindet und im gebundenen Zustand veränderte spektroskopische Eigenschaften besitzt. Wenn bei der späteren Analyse im zeitlichen Temperaturgradienten die entsprechenden Doppelstrangstrukturen denaturiert werden, wird der Farbstoff wieder freigesetzt. Dieser Vorgang wird spektroskopisch registriert. Eine notwendige Bedingung für diese Verfahrensweise ist jedoch, die Konzentration des freien Farbstoffes so zu wählen, daß sie größer ist als die Anzahl der freien Bindungsplätze. Andererseits führt eine Freisetzung des Farbstoffes aus einer Doppelstrangregion zur Bindung in einer anderen Struktur, ohne Änderung des Fluoreszenzsignales.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung wird die wäßrige Lösung des Reaktionskompartimentes mit einer vorzugsweise an der Verschußfolie kompartimentiert gelagerten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde unter Lösen der Sonde in Kontakt gebracht (Figuren 3 und 4). Nach Denaturierung und Renaturierung wird die Sonde fluoreszenzspektroskopisch verfolgt. Bei tiefen Temperaturen be-

- 26 -

findet sich die Sonde im Doppelstrang-Hybrid mit amplifiziertem Standard (Homoduplex) und amplifiziertem Template (Heteroduplex). Nun wird das Reaktionskompartiment zeitlich, vorzugsweise linear aufgeheizt, wobei zunächst der Heteroduplex partiell oder vollständig denaturiert und anschließend der Homoduplex partiell oder vollständig denaturiert. Aus dem relativen Verhältnis der Denaturierungssignale, gemessen über die Stufen der Fluoreszenzabnahmen (Figuren 9a bis 9e), läßt sich exakt der Template-Titer kalkulieren.

Als Denaturierungssignal wird vorzugsweise ein Fluoreszenzmarker verwandt. Insbesondere eignen sich hierzu Fluoreszenzfarbstoffe, die die Eigenschaft besitzen, nur dann stark zu fluoreszieren, wenn sie zwischen den Basenpaaren eingelagert werden (Interkalation). Wenn solche Farbstoffe aus einer Doppelhelix infolge eines Denaturierungsprozesses freigesetzt werden, so läßt sich das an einer Veränderung der Fluoreszenzintensität registrieren (Fluoreszenzabfall). Haben Doppelhelices unterschiedliche Stabilität wie im Falle von Homoduplex und Heteroduplex, dann finden diese Signaländerungen bei unterschiedlichen Temperaturen statt und lassen sich getrennt analysieren und auswerten. Die exakte Denaturierungstemperatur reflektiert darüberhinaus mögliche Sequenzunterschiede als Indikator für sogenannte Virusdrifts, die infolge von Mutation auftreten können.

Interkalierende Farbstoffe besitzen gelegentlich eine weitere günstige Eigenschaft, die sich auf die Halbwertszeit des angeregten Zustandes bezieht. Im Falle von Ethidiumbromid ist die Lebensdauer des Anregungszustandes mehr als 10 x länger, wenn sich das Fluoreszenzmolekül im interkalierten Zustand befindet. Dadurch läßt sich eine getaktete Laseranregung verwenden, wobei die Fluoreszenzintensität in der nachfolgenden Phase der Fluoreszenz-

- 27 -

emission ohne Streulicht-Einflüsse des Anregungslichtes gemessen werden können. Es ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, Farbstoffe wie Ethidiumbromid vorzugsweise in niedriger Konzentration (vorzugsweise 10^{-10} bis 10^{-7} M) zu verwenden.

Außer der direkten Messung einer Fluoreszenzintensität läßt sich auch erfindungsgemäß ein sogenannter Förster-Transfer (Energy-Transfer) zwischen eng benachbarten Fluorophoren oder der Parameter der Fluoreszenzpolarisierung verwenden.

Eine hohe Spezifität des erfindungsgemäßen Verfahrens wird erzielt, wenn eine Sonde verwendet wird, die kovalent mit einem oder mehreren Farbstoffmolekülen verknüpft ist (Figur 4). Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß ein Primer zur Herstellung der Sonde verwendet wird, der endständig oder intern mindestens ein Farbstoffmolekül trägt. Nur wenn sich die Sonde im Zustand der Basenpaarung des Homoduplex oder Heteroduplex befindet, erhält man eine maximale Fluoreszenzintensität des Doppelstrang-interkalierten Fluoreszenzfarbstoffes. Die Fluoreszenzintensität der parallel geführten Reaktionsansätze kann simultan mit Hilfe einer Kamera erfaßt werden. Die Einzelauswertung der Kanäle ergibt einen Fluoreszenzverlauf, wie er typisch in Figur 9 dargestellt ist. Die relative Höhe der Fluoreszenzänderungen kann über einen On-Line angeschlossenen Computer direkt in Kopienzahlen umgerechnet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Reaktion innerhalb des Kompartimentes teilweise Festphasenträger-gekoppelt durchgeführt (Figur 12). Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist darin begründet, daß sich mit Hilfe einer Laser-Optik gezielt die Oberfläche eines Festphasenträgers, oder alternativ die Lösung ohne den Festphasenträ-

- 28 -

ger, vermessen läßt. Das bedeutet für die praktische Durchführung, daß ein Fluoreszenzfarbstoff Verwendung finden kann, der nicht notwendigerweise seine meßbaren Parameter über Interkalation verändert. Somit können Sonden mit beliebigen, oligomeren Farbstoffen verwendet werden, mit denen eine mehr als zehnfache Steigerung der Fluoreszenzintensität erreicht werden kann. Der thermisch induzierte Denaturierungsprozess (siehe oben) kann dann verfolgt werden, indem die Dissoziation der Sonde von oberflächen-gebundenen, amplifizierten Nukleinsäuren (Probe und Standard) in die freie Lösung über die Abnahme der Fluoreszenz gemessen wird (Verdünnungseffekt). Dieses Vorgehen ist auf solche Analysen beschränkt, bei denen die zur Standardisierung herangezogene Doppelstrangregion in der thermodynamisch stabilsten Schmelzregion der Nukleinsäure liegt, oder bei Sonden, die nur eine Schmelzregion aufweisen.

Auf einen Zusatz einer markierten Sonde nach erfolgter Amplifikation kann verzichtet werden, wenn die Sonde aufgrund bestimmter Eigenschaften und Prozessführung der Amplifikation nicht am Amplifikationsgeschehen teilnehmen kann. Das kann erfindungsgemäß erreicht werden, wenn die Sonde in einer thermodynamisch stabilen Doppelstrangstruktur vorliegt, die während des Amplifikationsprozesses stabil bleibt und nicht am Reaktionsgeschehen teilnimmt. Es lassen sich z.B. markierte RNA-Doppelhelices hoher thermodynamischer Stabilität oder chemisch modifizierte Sonden einsetzen. Auf diese Weise läßt sich der Amplifikationsprozess so steuern, daß die Sonde bei der Amplifikationsreaktion immer doppelsträngig bleibt und am Amplifikationsgeschehen nicht teilnimmt, sei es, daß die Denaturierungstemperatur nicht ausreichend ist oder die beteiligten Enzyme doppelsträngige RNA oder die modifizierte Sonde nicht amplifizieren.

Amplifikationstechniken bergen die große Gefahr in sich, daß nach erfolgter Amplifikation, amplifizierte DNA- oder

- 29 -

RNA-Moleküle in die Umgebung austreten können. Besondere Gefahr ist immer durch Aerosolbildung gegeben, die technisch nur schwer zu beherrschen ist. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es jedoch in seiner besonderen Ausführung, Amplifikationsreaktionen und Analytik am hermetisch geschlossenen Reaktionsgefäß durchzuführen und dieses anschließend im geschlossenen Zustand zu entsorgen. Damit wird ein ganz entscheidender Beitrag zur molekularen Laborhygiene und für die Sicherheit der Ergebnisse einer Routinediagnostik geleistet.

Eine Routinediagnostik ist unmittelbar mit der Notwendigkeit einer Archivierung der Ergebnisse und - nach Möglichkeit - der analysierten Proben verbunden. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet hier wiederum eine nahezu ideale Möglichkeit:

- Die Folien lassen sich mit Test-spezifischer Strichmarkierung ausstatten und somit bezüglich Zieltest, Herstelldatum, Verfallsdatum etc. charakterisieren und datenmäßig erfassen.
- Die Folien lassen sich im hermetisch verschlossenen Zustand über lange Zeiträume archiviert lagern.
- Analysen lassen sich zu späteren Zeitpunkten wiederholen und überprüfen.
- Liefert die erfindungsgemäße Analysenmethode Indizien für das Vorliegen neuer interessanter DNA/RNA-Varianten, läßt sich das Probengemisch entnehmen und direkt auf dem flächigen Temperatur-Gelelektrophorese-Trennsystem präparativ auftrennen und z.B. einer Sequenzanalyse unterziehen.

- 30 -

Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese hatte für kleinere Serien ihre Zuverlässigkeit für eine quantitative Amplifikationsanalytik gezeigt. Bei dieser Technik werden vorzugsweise solche PCR-Amplifikate verwendet, die G:C-reiche, primer-kodierte Sequenzen am stabileren Fragmentende tragen. Diese sogenannten G:C-Klammern garantieren den für eine Temperatur-Gelelektrophorese-Analyse notwendigen reversiblen Schmelzverlauf und unterdrücken eine vorschnelle Dissoziation der Fragmente in die Einzelstränge. Für eine Vielzahl von Analysen mit temperaturabhängiger Gelelektrophorese werden G:C-Klammern, die kostspielig im Einsatz sind und bei der Amplifikation Schwierigkeiten verursachen können, nicht mehr erforderlich sein. Die sequentielle Freisetzung der Fluoreszenzfarbstoffe in einem Assay kann durchaus irreversibel erfolgen, ohne daß das Ergebnis verfälscht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat beträchtliche wirtschaftliche Bedeutung, sowohl für die wirtschaftlichere Herstellung von Testkits, als auch in Bezug auf die Durchführungskosten der Analytik. Die Durchführung ist fast vollständig automatisierbar, wobei das Ergebnis der Analyse in Form eines Hard-Copy-Berichtes ausdrückbar ist. Damit ist die TEGSA-Technik nicht nur auf den Einsatz für kostspielige, quantifizierende Analysen großer Wertschöpfung beschränkt, sondern auch einsetzbar für preiswerte Analysen. Das betrifft z.B. den Bereich der Mikrobiologie, Humangenetik, Phytoanalytik, forensische Analytik und die industrielle Forschung wie z.B. die Wirkstoffforschung, das heißt Reihenuntersuchungen von Zielsubstanzen auf Wirkstoffe, die über DNA- oder RNA-Amplifikation oder -Modifikation bewertet werden können bis hin zu einfachen Toxizitätstests.

Das erfindungsgemäße Verfahren mit seinen vorteilhaften Eigenschaften wie

- 31 -

- PCR/3SR/TAS-Amplifikationseffizienz
- Eignung für Reihen- und Einzeluntersuchungen
- On-Line-Registrierung
- simultane Nukleinsäuren - Qualifizierung/Quantifizierung
- Eintopf-Mehrkomponenten Analyse
- Wegfall der Kontaminationsgefahr durch Amplifikate
- Niedrigkosten der Testreagenzien und Testdurchführung
- allgemein gültige - keine Test-spezifischen - Verfahrensprotokolle

erlaubt neue Einsatzmöglichkeiten der Amplifikationstechniken wie PCR, 3SR oder TAS.

In der genetischen Analytik wird auf längere Sicht ein Screening-Programm angestrebt, mit dem es beispielsweise möglich ist, aus Spuren von Biopsie-Material oder Fruchtwasserproben schwere genetische Erkrankungen nachzuweisen. Die Kostenbelastung für großflächige Programme ist hierbei ebenso eine entscheidende Restriktion wie die Tatsache, daß nur in den seltensten Fällen eine Analyse eines einzigen Genlocus ausreichend ist, Aussagen über das Überträgerpotential zuzulassen. Für die häufigste letale Erberkrankung in der kaukasischen Bevölkerung, der Cystischen Fibrose, sind neben der zunächst gefundenen Mutation (Delta 508) mehr als 18 weitere Mutationen beschrieben worden, die die Mukoviscidose auslösen können. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt bei niedrigem zusätzlichem Kostenaufwand, eine große Anzahl von loci parallel zu analysieren und bei Bedarf - ohne großen Zusatzaufwand - weitere Testpositionen hinzuzunehmen. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt beispielsweise auch die Untersuchung von Punktmutationen, die für bestimmte genetische Erkrankungen verantwortlich sind. Solche Erkrankungen können bislang nur mit der sehr schwer handhabbaren Allel-spezifischen Oligonukleotid-Hybridisierungstechnik (ASO) diagnostiziert werden.

- 32 -

Ähnlich bedeutungsvoll ist die Technologie für Thalassämie Screenings.

Damit wird deutlich, daß das erfindungsgemäße Verfahren auch die bisherigen Methoden zum Aufspüren von definierten Mutationen vereinfachen und erheblich kostengünstiger gestalten kann. Anstelle einer künstlich eingeführten Mutation, kann zur Normierung oder Standardisierung die gesuchte, natürlich auftretende Mutante eingesetzt werden, bzw. als Sonde verwandt werden. Somit kommen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens alle diejenigen Assays in Betracht, die z.B. mit differentiellen Oligonukleotid-Hybridisierungen als Filterassays durchgeführt werden.

Epidemiologische Studien bei Infektions- und Erberkrankungen werden für die internationale Medizin zu einem immer wichtigeren Aufgabengebiet. Erinuert sei an die beängstigende Ausbreitungsgeschwindigkeit moderner viraler Erkrankungen wie AIDS (HIV), bedingt durch die veränderten soziobiologischen Strukturen. Eine entscheidende Voraussetzung für Vaccinierungs- und Therapieansätze ist eine möglichst umfassende und sorgfältige epidemiologische Erfassung des Ist-Zustandes mit epidemiologisch-prognostischer Bedeutung. Dies betrifft nicht nur das Auftreten des Virus selbst, sondern auch die geografische Verteilung seines Variantenspektrums mit einer datenmäßigen Erfassung der Krankheitssymptomatik. Solche Studien werden erst durch eine aussagefähige automatisierte Analytik wirtschaftlich vertretbar.

Die Pharmaforschung stößt seit geraumer Zeit an die Grenzen der Machbarkeit auf ihren angestammten Aktivitätsfeldern. Es gibt viele Versuche, den offensichtlichen Beschränkungen herkömmlicher Pharmaforschung durch neue Konzeptionen zu begegnen. Angeführt sei das Beispiel des strategisch-intelligenten Wirkstoffdesign, das es er-

lauben soll, auf der Basis fundierten Wissens über eine Zielstruktur wie der eines Rezeptors, Effektormoleküle mit vorberechneter Struktur gezielt zu synthetisieren und somit herkömmliche Screening Methoden zu ersetzen. Eine zweite zukunftssträchtige Strategie ist die evolutive Biotechnologie mit ihrem Potential, unter Ausnutzung evolutiver Systeme, Stoffe mit erwünschtem Wirkpotential zu generieren. In der Pharmaforschung der Zukunft müssen aus Kostengründen als auch projektbedingt personalintensive, randomisierte Syntheseprogramme vermieden werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann hierbei einen wichtigen Beitrag leisten. Die Tauglichkeit für Reihenuntersuchungen mit quantifizierenden DNA/RNA-Tests bei niedrigen Kosten erlaubt es, neue Tests für automatisiertes Aufspüren von Wirkstoffen in der Onkologie, bei viralen und bakteriellen Infektionen sowie Tests für toxikologische Studien aufzubauen. Es werden neue Assay-Systeme in Kombination mit zellulären in vitro-Systemen denkbar, die mehr und mehr Tiermodelle ersetzen werden. Dabei darf auch nicht vergessen werden, daß Kultivierungs- und Testzeiten erheblich verkürzt werden, da z. B. Variationen auf dem mRNA-Level unmittelbar erfaßt werden, ohne daß langwierig zelluläre Folgereaktionen gemessen werden müssen. Für eine Reihe von Assays könnte es möglich werden, transformierte Zellkulturen durch Primärkulturen z. B. aus Blut zu ersetzen. Die gleichzeitige hohe Sensitivität würde es auch erlauben, Differenzierungsparameter zu registrieren, um Zelltypspezifische Wirkungen zu messen. Gedacht ist z.B. an bestimmte Leukozyten-Subpopulationen (Makrophagen, T4-Zellen etc.) mit ihren charakteristischen Rezeptorfunktionen und Infizierbarkeiten mit Viren wie HIV.

Biologische Experimente mit rekombinanten Systemen, insbesondere Freisetzungsexperimente verlangen sowohl von

- 34 -

wissenschaftlicher Seite als auch von seiten des Umweltschutzes nach einer sorgfältigen Analytik von Genen, der Erfassung der Genpersistenz in Populationen, Genveränderungen und Genaktivitäten. Als Beispiel seien antivirale Therapien bei Pflanzen genannt, bei denen versucht wird, Virusresistenz gegen bestimmte Viren dadurch zu erzeugen, daß transgene Pflanzen konstruiert werden, die virale Hüllproteine erzeugen und so die Pflanzen vor Befall mit einem Fremdvirus schützen. Ein Freisetzungsexperiment oder ein Einkreuzen in natürlich vorkommende Populationen setzt ein genaues Wissen voraus, zum Beispiel:

- Wie ist das Segregationsverhalten der rekombinanten Pflanzen bezüglich des rekombinanten Locus?
- Wie aktiv sind die Hüllprotein-Gene bezogen auf die Population und die Generationszahl?
- Wie reagiert der virale Zielorganismus auf den neuen Selektionsstreß?

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht hier Reihenuntersuchungen und insbesondere die Erfassung von Probenkollektiven in einem einzigen Test, um quantitative Aussagen über Populationen zu erhalten. Gleichzeitig werden Drift-Phänomene bei Resistenzbildung verfolgbar.

Mikrobiologische Tests der Bakteriologie werden traditionsgemäß durch Kultivierung oder direkte Dot-Hybridisierung durchgeführt. Solche Tests waren bislang durch aussagefähigere Tests kaum zu verdrängen, allein bedingt durch den Kostenaspekt. Das erfindungsgemäße Verfahren kann diese Situation vollständig verändern. Es stellt bei diesem Verfahren keinen entscheidenden Kostenfaktor dar, wenn eine Probe simultan auf mehrere Erreger gleichzeitig getestet werden muß oder wenn ein Erreger in einem Antibiogramm analysiert werden muß.

- 35 -

Der letztgenannte Analysentyp kann insbesondere bei virologischen Analysen eine große Rolle spielen, wenn Virusresistenzen ausgetestet werden müssen bzw. quantifizierend erfaßt werden müssen. Für die Virologie ist das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft, da es eine stark vereinfachte Analytik durch eine kostengünstige und aufwandreduzierte Kopplung von Anzucht- und Testverfahren einer Viruspropagation erlaubt.

In der Nahrungsmittelindustrie wurden in erster Linie umfangreiche Kontrollen zur Untersuchung von einigen bestimmten mikrobiologischen Erregerklassen durchgeführt, jedoch ausgehend von einer Vielzahl von Probenmaterialien der Ausgangsprodukte, der Verfahrensschritte, des apparativen Containments und der Endprodukte. Ähnlich wie in der Pharmaindustrie werden bei der Verarbeitung Großansätze von erheblichem ökonomischen Wert bearbeitet. Die Minimierung der Analysendauer verbunden mit einer zuverlässigen Testaussage stellt hierbei einen kritischen Faktor dar. Zum Beispiel erfordern Salmonellentests häufig langwierige Anzüchtungsverfahren der Krankheitserreger. Das erfindungsgemäße Verfahren bewirkt mit seinen auch quantitativen Aussagen in Reihenuntersuchungen einen Verzicht auf Anzuchtverfahren und erspart kostspielige Prozessführungsschritte und Lagerungen.

Phytopathologische Analysen sind oft prohibitiv teuer. Selbst wenn in der Regel nur repräsentative Probenkollektive von Saatgut oder Zier- und Nutzpflanzen der Analyse beispielsweise auf Virusbefall zugeführt werden, so ließ die Anzahl der Proben aus Kostengründen bislang fast ausschließlich immunologische ELISA-Verfahren zu, die häufig nicht oder nur unzureichend funktionieren. Die Phytoanalytik bedarf also anderer Analysenkonzepte, um dem Bedarf gerecht zu werden. Diese Konzepte werden durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellt.

- 36 -

Nachdem nun erstmals RNA-Parameter gefunden worden sind, die eine exakte Wald-Schadensanalyse zulassen (Riesner et al., in Vorbereitung), läßt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ein umfangreiches Programm zur Erfassung und der zeitlichen und geographischen Ausbreitung von Waldschäden konzipieren.

Die Molekularbiologische Forschung bemüht sich in steigendem Maße um Analysenverfahren, die Serientauglichkeit haben, um beispielsweise das sogenannte HUGO-Projekt zur vollständigen Sequenzaufklärung des humanen Genoms sowie der Genome anderer wichtiger Organismen erfolgreich durchführen zu können. In Zukunft wird es bei diesem Projekt nicht nur darum gehen, ein singuläres Genom vollständig zu analysieren, sondern auch bestimmte Loci mit krankheitsbezogenem Potential zu analysieren, wie es vergleichbar bei Identitätsuntersuchungen notwendig ist (HLA-Analytik, Haplotyp-Assoziation, genetische Variabilität etc.).

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auf DNA Ebene (amplifizierte loci, Gendosis) und auf mRNA Ebene Expressionsoptimierungen, Promoterkontrolle etc. zu verfolgen und im Screening von Mutageneseverfahren einzusetzen. Dieses Verfahren erweist sich hierbei als eine wichtige Komplementärtechnik zum "cell sorting".

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von mindestens einer in vitro-amplifizierten Nukleinsäure in einem verschlossenen Reaktionsraum,
 - wobei während oder nach der Amplifizierung der Nukleinsäure mindestens eine Substanz (Sonde) vorhanden ist, die mit der nachzuweisenden Nukleinsäure in Wechselwirkung tritt,
 - wobei spektroskopisch meßbare Parameter der Substanz (Sonde) eine Änderung erfahren und dabei ein meßbares Signal erzeugt wird,
 - die zu messende Probe der Einwirkung eines Gradienten ausgesetzt wird, der Nukleinsäuren mindestens teilweise denaturieren kann
 - unter Erfassung des sich durch die Einwirkung des Gradienten ändernden meßbaren Parameters und
 - die gesamte Amplifikationsreaktion einschließlich der qualitativen und quantitativen Bestimmung in einem verschlossenen Reaktionsraum (Meßkompartiment) ohne zwischenzeitliche Öffnung durchführbar ist.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Sonde, deren spektroskopisch meßbarer Parameter mindestens ein Lumineszenz oder Fluoreszenzfarbstoff ist, einen Nukleinsäureanteil enthält und dessen Wechselwirkung mit den in vitro-amplifizierten Nukleinsäuren in Abhängigkeit des Denaturierungszustandes mit einer Änderung des spektroskopischen Meßsignals einhergeht, vorzugsweise durch Interkalation des Farb-

- 38 -

stoffes in die Nukleinsäuredoppelhelix oder durch Verdünnungs- oder Konzentrierungseffekt in dem Meßkompartiment.

3. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei ein Denaturierungsprozess über eine Änderung der Wellenlänge und/oder einen Lumineszenz bzw. Fluoreszenzintensitätsshift und/oder Fluoreszenzpolarisationsänderung und/oder eine Änderung der Lebenszeit eines angeregten Zustandes oder über das Prinzip des sogenannten "Energy Transfer" oder über einen Konzentrationseffekt erfaßt wird.
4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in einem Reaktionsraum mehrere, spektroskopisch voneinander unterscheidbare Farbstoffe eingesetzt werden, mit denen sich verschiedene amplifizierte Nukleinsäuren analysieren lassen und/oder über die mindestens eine unabhängige Eichsubstanz eingeführbar ist.
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz der Farbstoffe durch einen Laser kontinuierlich oder getaktet angeregt wird.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amplifizierten Nukleinsäuren mindestens einen koamplifizierten Nukleinsäure-Standard enthalten, dessen Sequenz zu einer zu bestimmenden Sequenz homolog ist, vorzugsweise identisch mit Ausnahme mindestens einer Punktmutation, die vorzugsweise in einem Sequenzbereich niedrigster Stabilität liegt, jedoch außerhalb der primer-Bindungsstellen bei enzymatischer Amplifikation.

7. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die amplifizierten Nukleinsäuren mindestens einen koamplifizierten Nukleinsäurestandard enthalten, dessen Sequenz mindestens in den Primer-Regionen absolut homolog ist, ansonsten jedoch die Sequenz des Nukleinsäurestandards von der Sequenz der amplifizierten Nukleinsäure in mehr als einer Position abweicht.
8. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäure Standard teilweise selbst ein natürlicher Bestandteil der zu analysierenden Nukleinsäure ist.
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation in homogener Phase oder mit einem Festphasenträger gekoppelten Primer durchgeführt wird, an dessen verlängerter Sequenz die markierte Sonde hybridisieren kann und deren Konzentration und/oder Konformation somit entweder gezielt auf dem Festphasenträger oder in der freien Lösung bestimmt werden kann.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Fluoreszenzfarbstoff an ein Nukleinsäuremolekül gekoppelt ist, dessen Sequenz identisch oder homolog mit der nachzuweisenden Nukleinsäure oder dem koamplifizierten Nukleinsäure-Standard ist.
11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Nukleinsäuremolekül dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Amplifikation zugesetzt wird, wobei die Hybridisierung mit den amplifizierten Nukleinsäuren durch einen thermischen Denaturierungs-

- 40 -

schritt mit nachfolgendem Renaturierungsschritt erfolgt.

12. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Nukleinsäuremolekül dem Reaktionsgemisch vor erfolgter Amplifikation zugesetzt wird, wobei die Sonde als nicht amplifizierbare Doppelstrang-RNA oder als nicht amplifizierbare chemisch modifizierte Nukleinsäure zugesetzt wird.
13. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Amplifikation vorzugsweise ein Primer eines Primerpaares verwendet wird, der 5'-terminal eine G:C-reiche Region kodiert von vorzugsweise 15 bis 20 G:C - Resten.
14. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Bestimmung verwendete Sonde ein Oligo- oder Polynukleotid ist, welches mindestens zwei chemische Strukturelemente aufweist, die in der Lage sind elektromagnetische Wellen zu absorbieren und/oder aufgrund einer Anregung zu emittieren und wobei eines der Strukturelemente durch Einfluß elektromagnetischer Wellen eine dauerhafte Bindung zu einer anderen Position des Oligo- oder Polynukleotids zu knüpfen oder zu lösen vermag.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das eine elektromagnetische Welle absorbierende und/oder emittierende Strukturelement ein chromophores System aufweist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das chromophore System Farbstoffsubstituent luminesziert.
17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei das unter elektromagnetischem Einfluß

- 41 -

dauerhafte Bindungen knüpfende oder lösende Strukturelement ein photochemischer Vernetzer ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei der photochemische Vernetzer ein Psoralenderivat ist.
19. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei der Abstand der Strukturelemente 8 bis 12, vorzugsweise 10, Nukleotidpositionen nicht unterschreiten darf.
20. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß Foliensysteme mit Vertiefungen oder Ausbuchtungen als Reaktionsräume verwendet werden, die thermisch verschweißbar sind und als Aufnahme für verwendungsfertige Reagenzien-gemische in lyophilisierter oder Matrix-gebundener Form dienen, sowie zur direkten optischen Vermessung geeignet sind.
21. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die vorgelegten Reagenzien in räumlich getrennten Matrices gelagert werden und nach dem Schließen eines Reaktionsraumes zeitlich getrennt dem Reaktionsgeschehen zugeführt werden können.
22. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Abstand der Reaktionsräume so gewählt ist, daß eine Auswertung mit kommerziellen Apparaturen, wie mikrotitrations-formatierten Geräten erfolgt.
23. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuregemisch zur Analyse einem zeitlich gesteuerten Tem-

- 42 -

peraturgradienten unterworfen wird mit vorzugsweise linearem Verlauf, wobei die Änderung des spektroskopischen Parameters als Funktion der Zeit und/oder der Temperatur verfolgt wird.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, wobei die Analyse der Konformation des Nukleinsäuregemisches mit Hilfe der Temperaturgelelektrophorese, einem chromatographischen Verfahren oder direkt in homogener Lösung oder in Kombination dieser Verfahren erfolgt.
25. Verfahren gemäß Anspruch 23 und/oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß aus der Abhängigkeit des optischen Parameters mit der Temperatur und/oder der Zeit auf die Anwesenheit und/oder Anzahl und/oder Homologie einer gesuchten Nukleinsäure zum korrespondierenden Standard geschlossen werden kann.
26. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Auswertung der Daten on line durch ein Datenverarbeitungssystem erfolgt.
27. Oligo- oder Polynukleotid-Sonde zur Durchführung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 26 mit mindestens einem chemischen Strukturelement, das in der Lage ist mit elektromagnetischen Wellen unter Lösen oder Knüpfen dauerhafter Bindungen und/oder durch Absorption oder Emission von Strahlung in Wechselwirkung zu treten und wobei dieses Strukturelement nicht ein Purin- oder Pyrimidin-Substituent der natürlich vorkommenden Nukleotidbausteine darstellt.
28. Sonde nach Anspruch 27, wobei das dauerhafte Bindungen zu knüpfen vermögende Strukturelement Psoralen oder ein Psoralenderivat ist.

- 43 -

29. Sonde nach einem der Ansprüche 27 und/oder 28, wobei mindestens eines der mit elektromagnetischer Strahlung in Wechselwirkung zu treten vermögende Strukturelement luminesziert.
30. Sonde nach mindestens einem der Ansprüche 26 bis 29, wobei der Abstand der Strukturelemente des Oligo- oder Polynukleotids mindestens 8 bis 12 Nukleotide beträgt.
31. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 30, die eine rechnergesteuerte, zeitabhängige Thermostatierung der Reaktionskompartimente erlaubt.
32. Vorrichtung gemäß Anspruch 31, die eine optische Einheit enthält, wobei vorzugsweise ein Laser zur Anregung eingesetzt wird sowie eine optische Detektionseinheit zur Registrierung des emittierten Fluoreszenzsignals.
33. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 26, bestehend aus einem System von Reaktionskompartimenten, vorzugsweise einem Foliensystem mit gebrauchsfertigen Reagenzien in lyophilisierter Form, wobei die Reaktionskompartimente vorzugsweise in der Mikrotiter-Dimensionierung angeordnet sind.
34. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien in mindestens einer wasserlöslichen Matrix fixiert und/oder gelagert werden.
35. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß Anspruch 33 und/oder 34, wobei die Matrix Stabili-

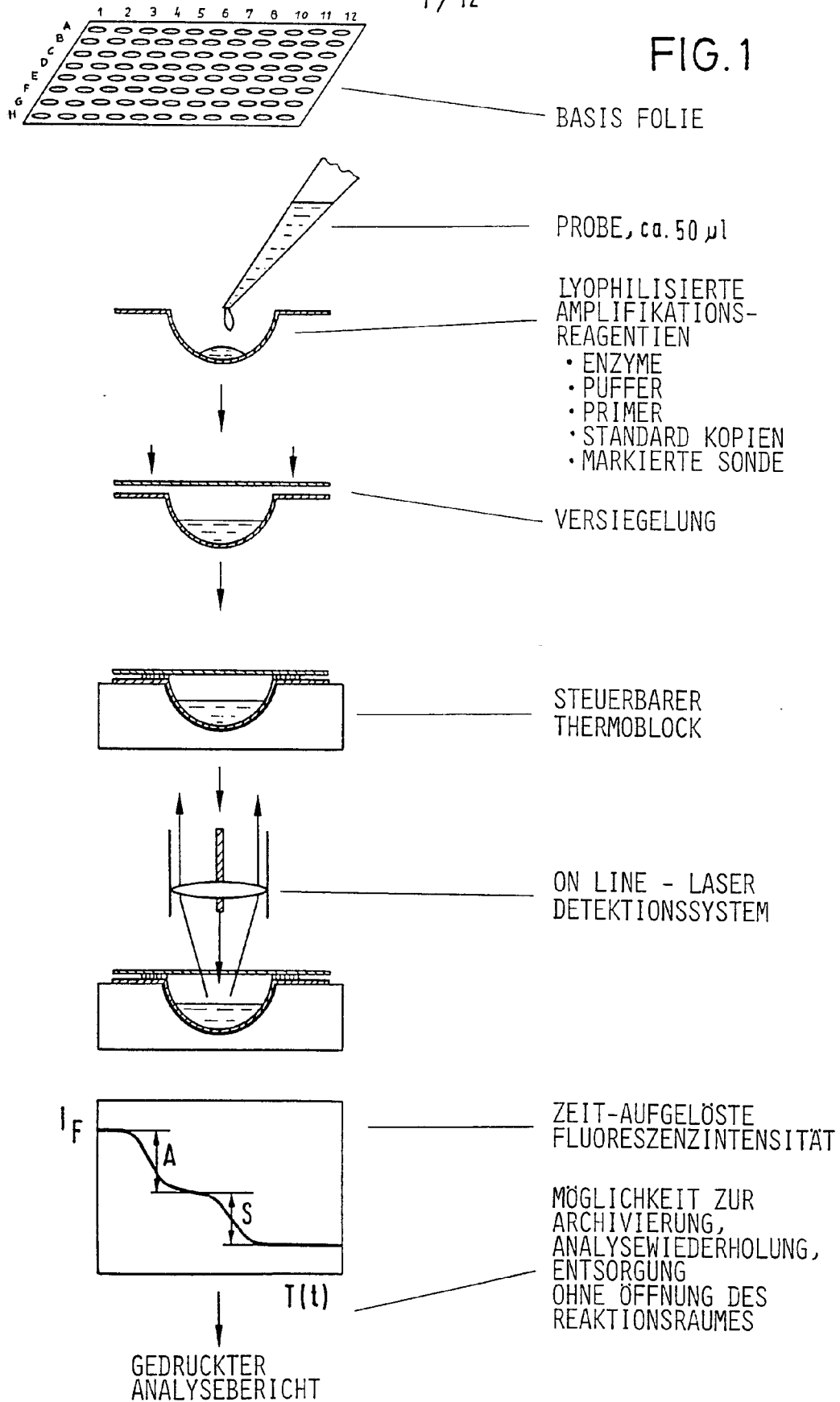
- 44 -

satoren enthält, vorzugsweise Zucker, insbesondere Trehalose oder Saccharose.

36. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß mindestens einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei das Reaktionskompartiment und/oder weitere Reagenzienreservoirs Amplifikationsprimer, Pufferbestandteile, mindestens eine Polymerase und Kofaktoren enthält.
37. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei die Reaktionskompartiment-verschließende Folie mindestens ein weiteres Reagenzienreservoir in einer Matrix enthält, wobei vorzugsweise dort die markierte Sonde mit den für die Hybridisierung notwendigen Reagenzien gelagert ist.
38. Mittel gemäß mindestens einem der Ansprüche 33 bis 37 in Kit-Systemen zusammengestellt.

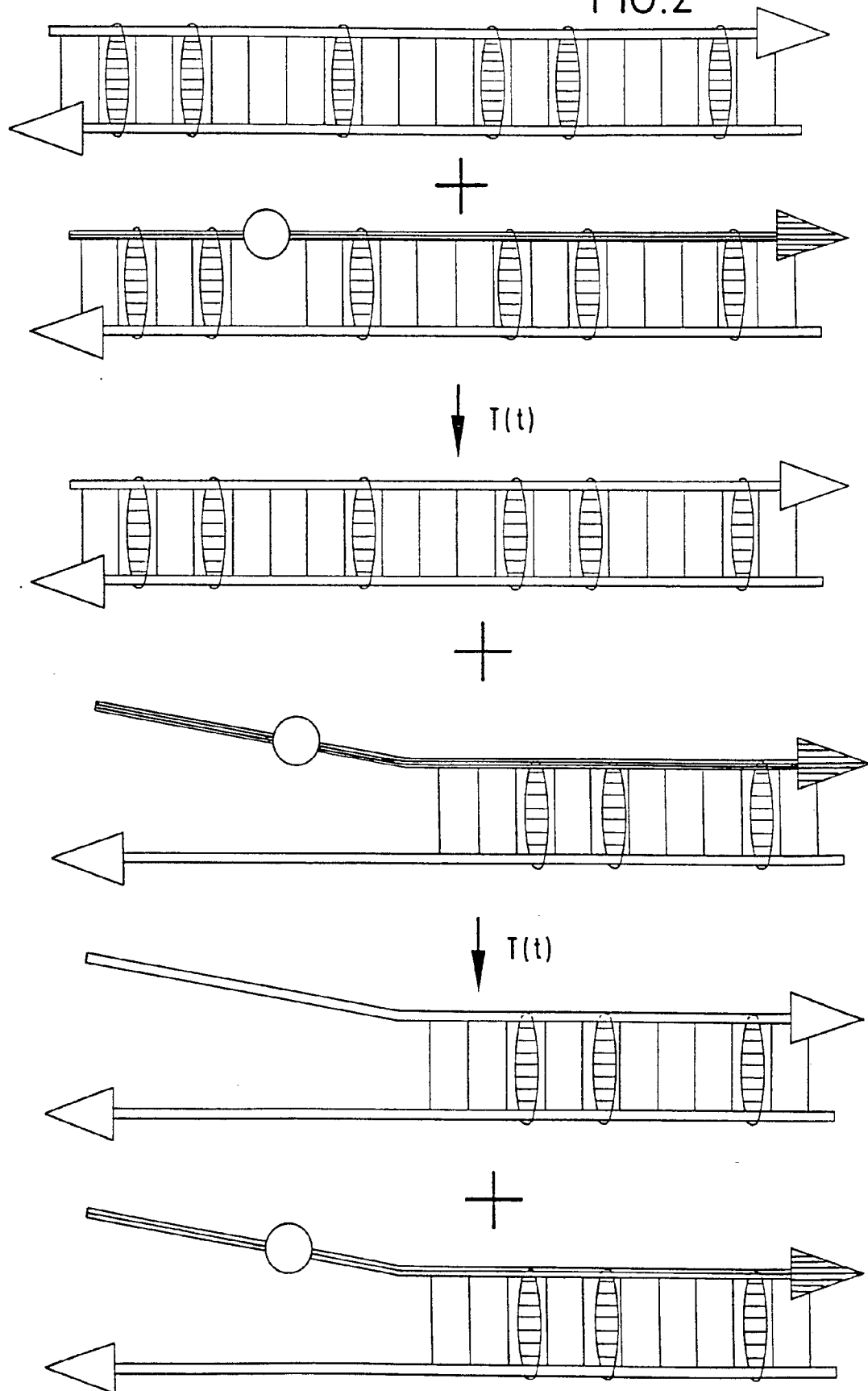
-1/12-

FIG.1



- 2/12 -

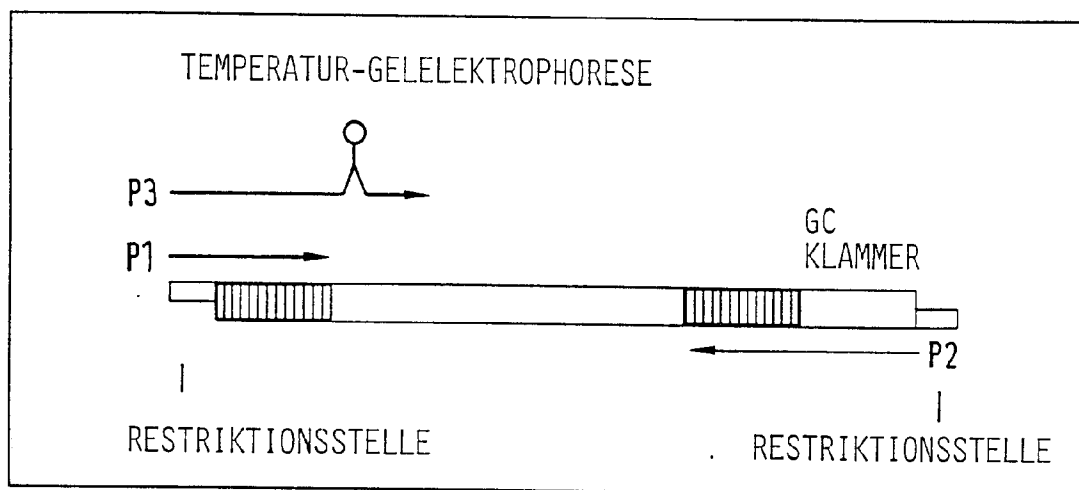
FIG. 2



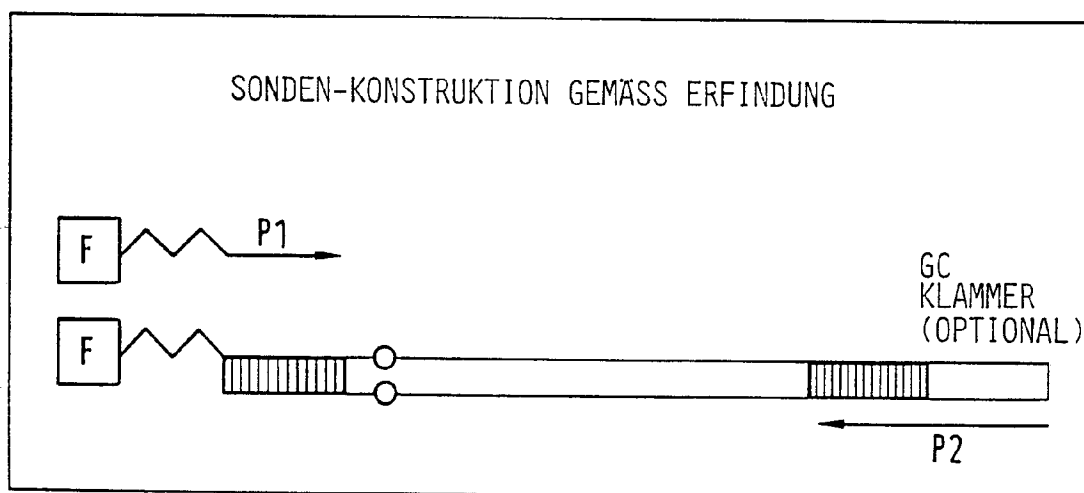
ERSATZBLATT

- 3 / 12 -

FIG.3



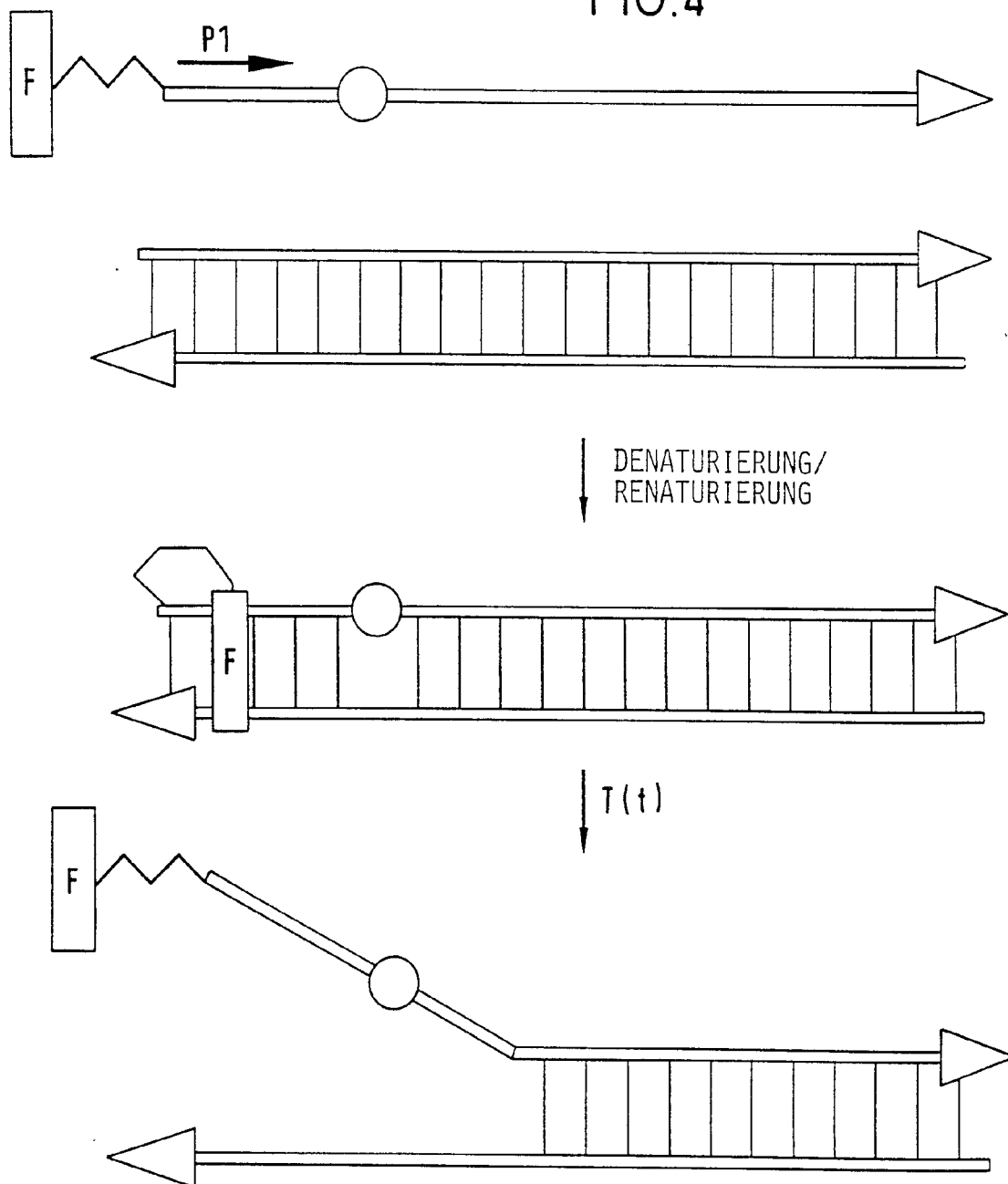
a)



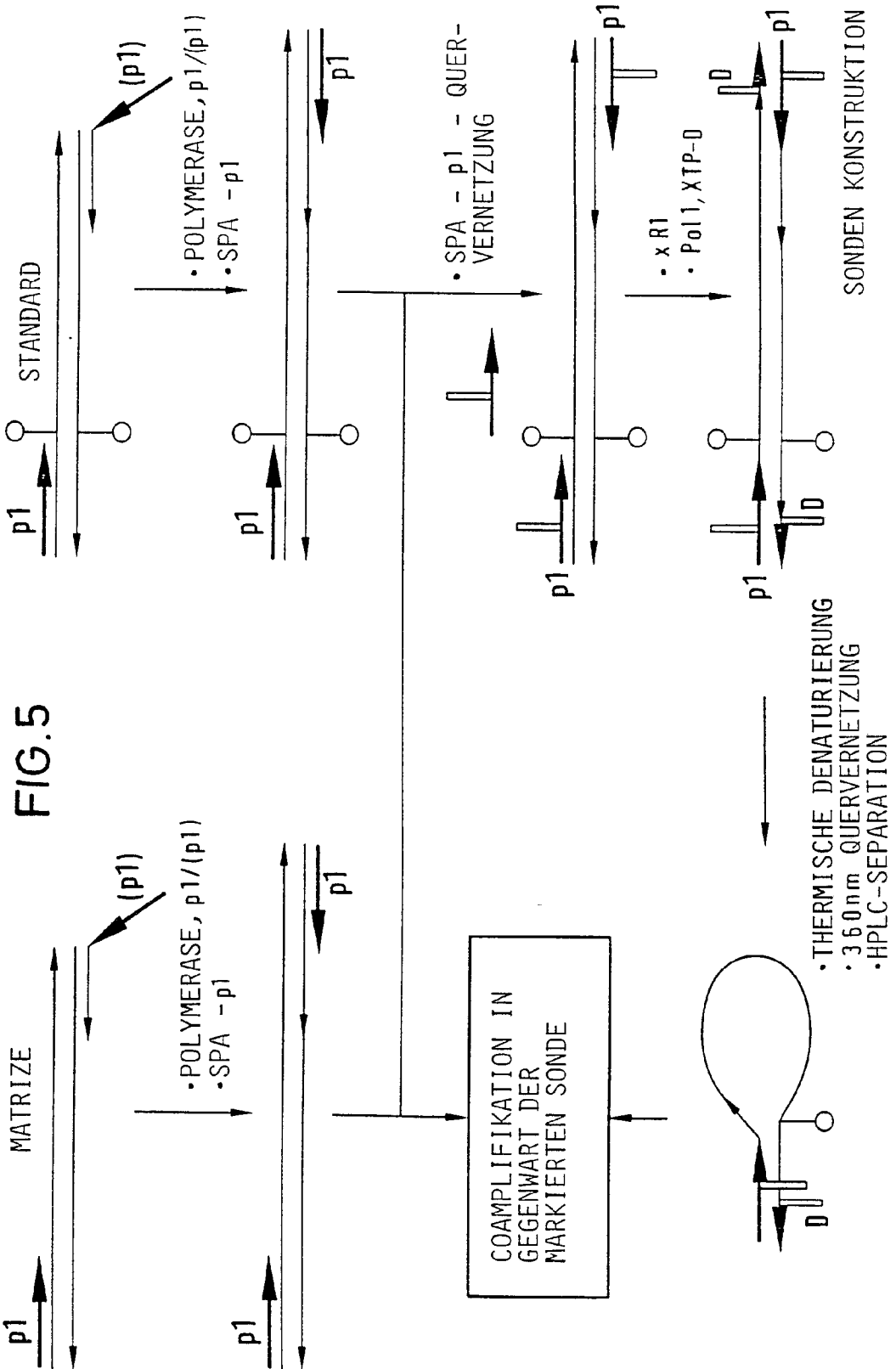
b)

-4/12-

FIG. 4

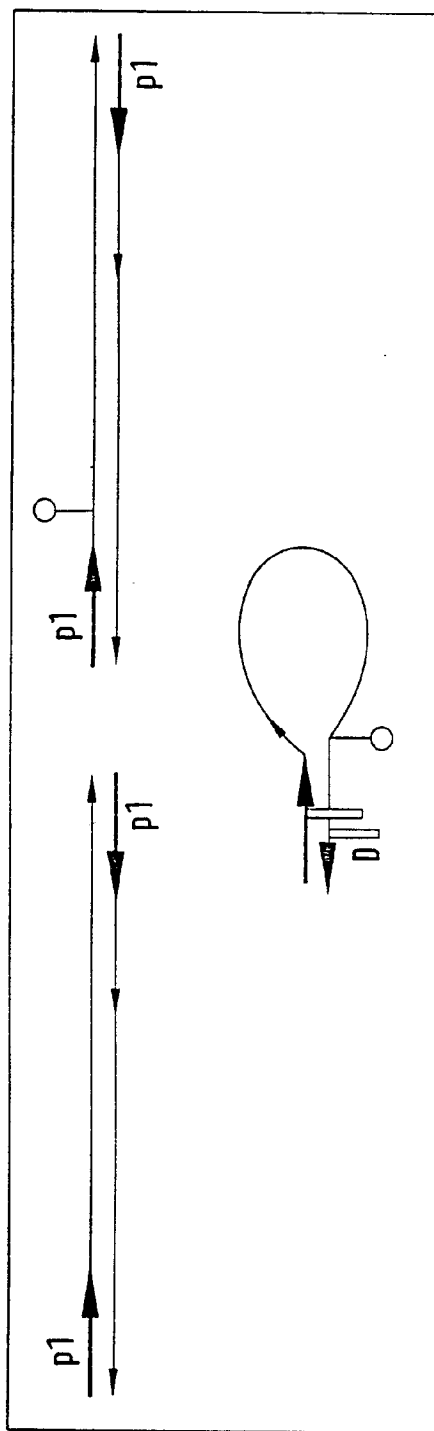


-5/12-



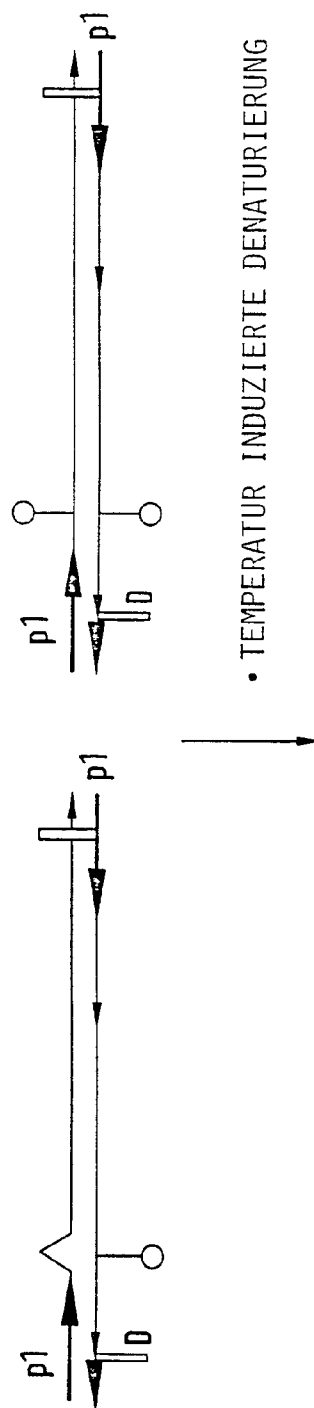
- 6/12 -

COAMPLIFIKATION
IN GEGENWART
DER MARKIERTEN
SONDE

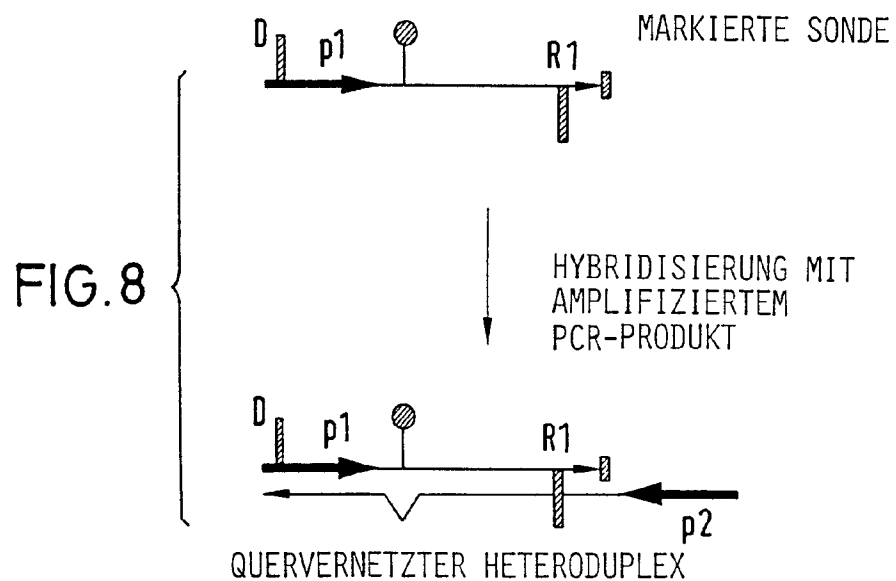
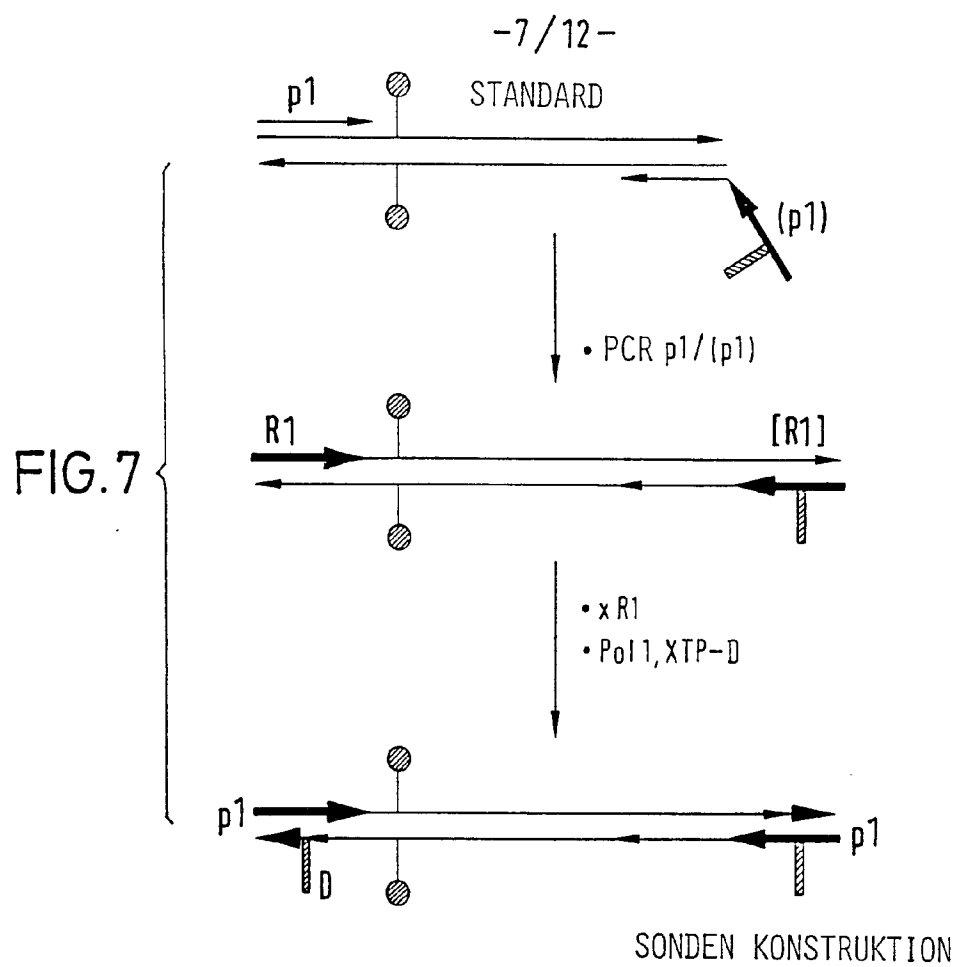


- 254 - 310 nm
- DENATURIERUNG/RENATURIERUNG
- 360 nm

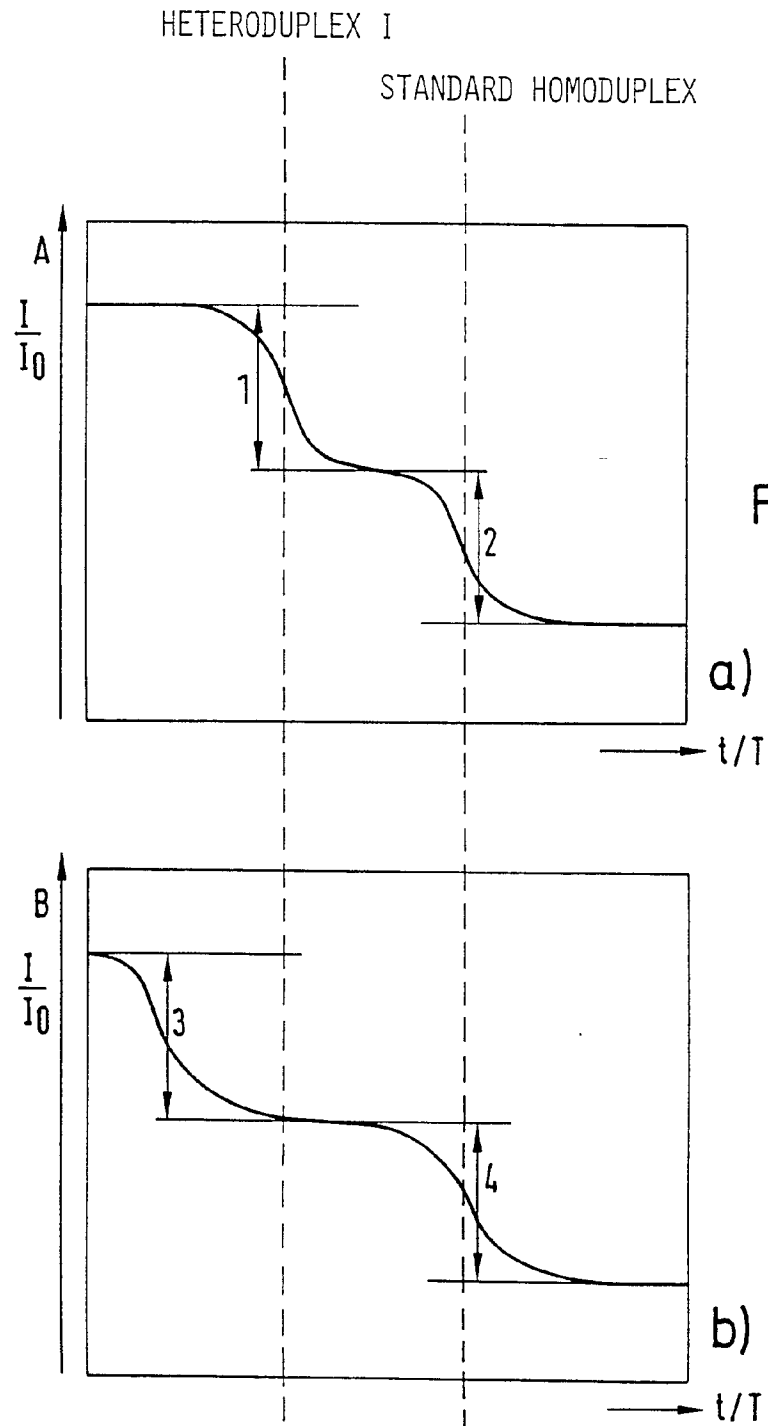
FIG. 6



- TEMPERATUR INDUZIERTE DENATURIERUNG



- 8/12 -

DIE EXPERIMENTELLEN ERGEBNISSE
(SCHEMATISCH)

-9/12-

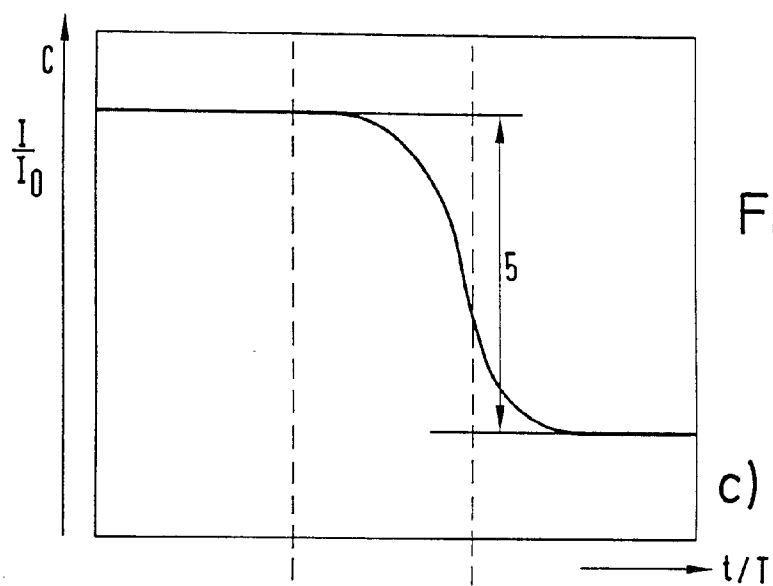
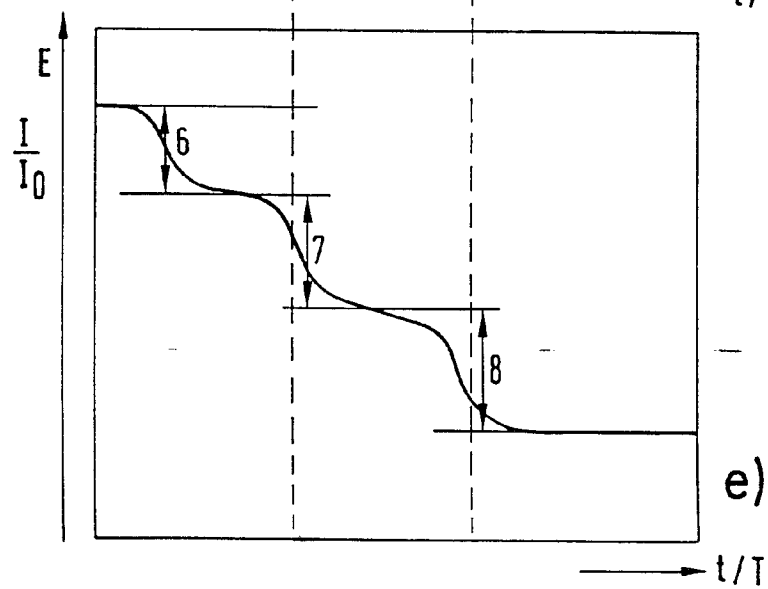
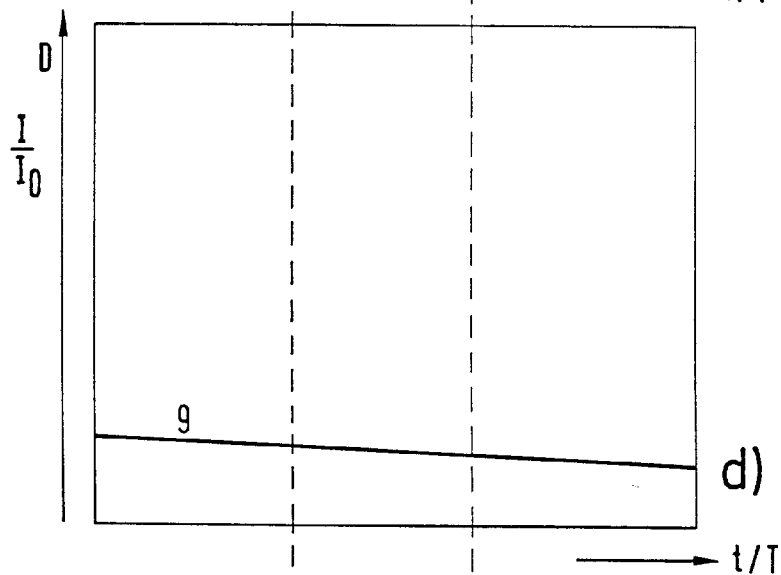


FIG.9



-10/12-

PROGRAMMABLAUF

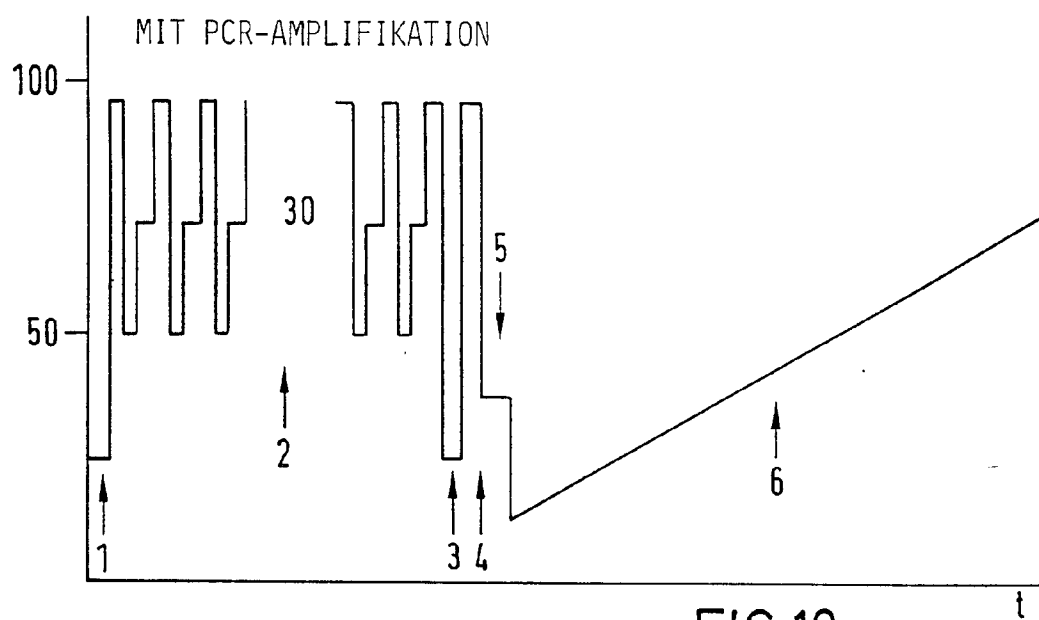


FIG.10a

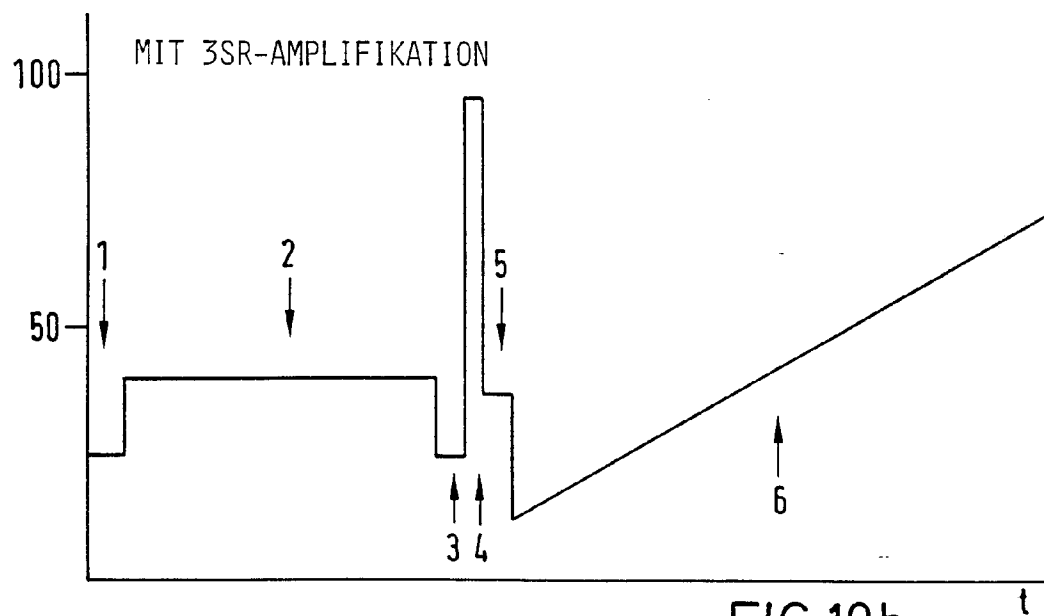
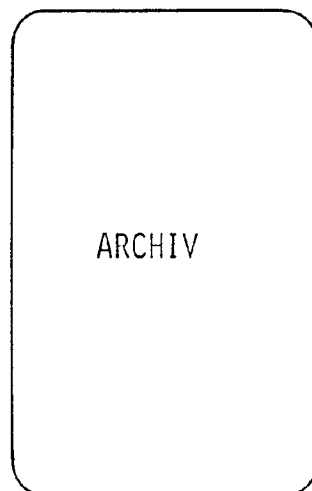
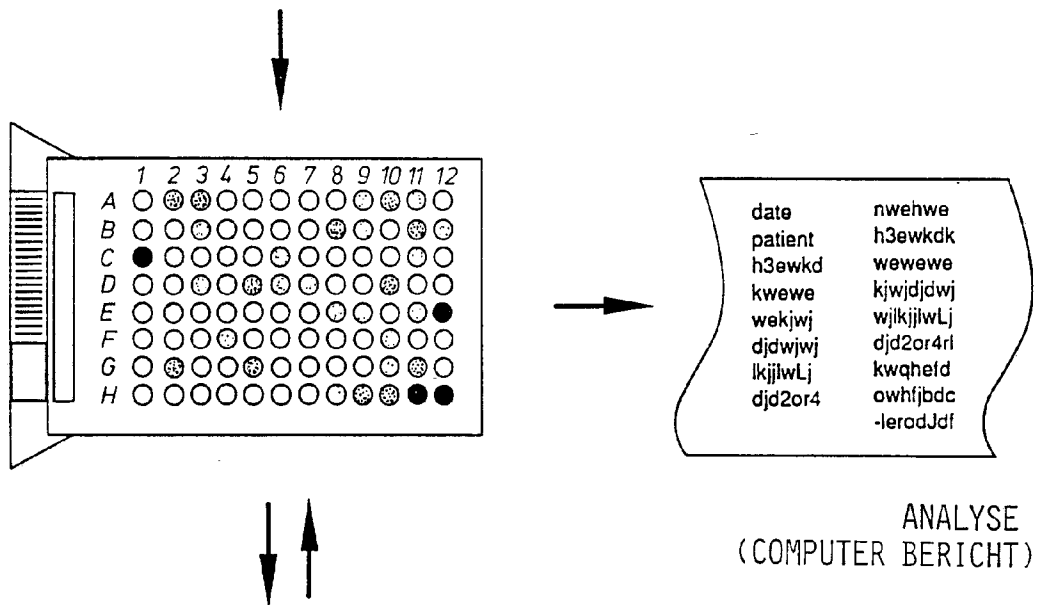
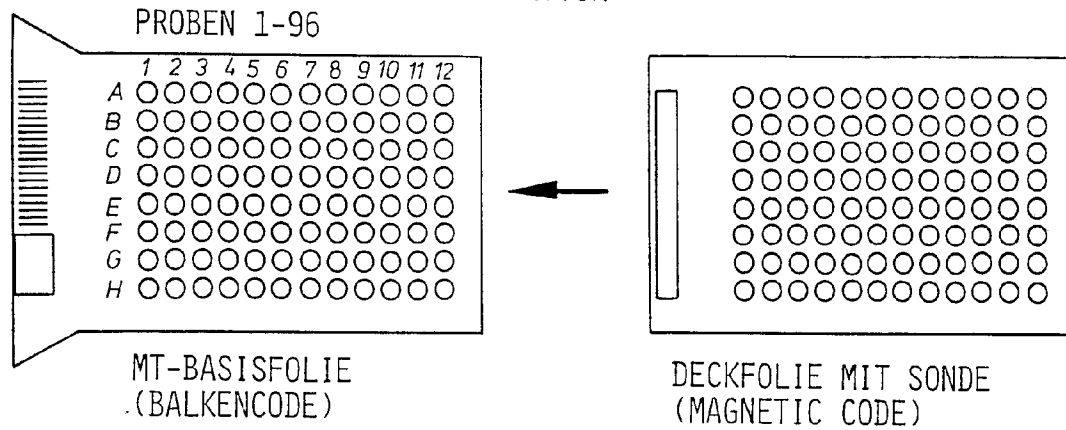


FIG.10b

-11/12-
ANALYTIK



FORSCHUNG &
MOLEKULARE ANALYTIK

- TEMPERATUR-
GELELEKTROPHORESE
- SEQUENZIERUNG

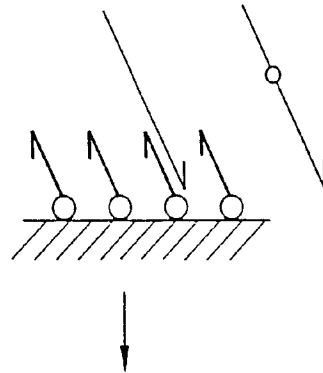
FIG.11

ERSATZBLATT

-12/12-

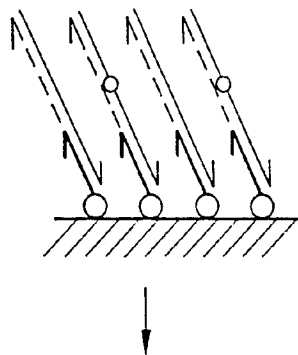
VERDÜNNUNGSASSAY

FIG.12

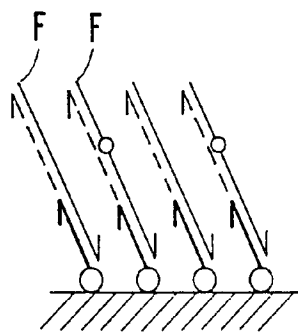


AMPLIFIKATION ÜBER
OBERFLÄCHEN-GEBUN-
DENEM PRIMER P2

AMPLIFIKATION



- SONDENZUSATZ
- HYBRIDISIERUNG



DIE TEMPERATUR-INDUZIERT SEQUENTIELLE
DISSOZIATION FÜHRT ZU EINER VERDÜNNUNG
DER OBERFLÄCHEN-GEBUNDENEN FLUORESCENZ-
FARBSTOFFE BZW. DEREN KONZENTRATION
IN LÖSUNG

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/00254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ C 12 Q 1/68; B 29 C 51/00; B 01 L 7/00; B 29 C 65/02
 B 65 B 9/04; G 05 D 23/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C 12 Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, A, 9 102 815 (DIAGEN INST. FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 7 March 1991 cited in the application	1-22 27-29, 33
A	see the whole document cited in the application	23-26, 31-32
P, Y	WO, A, 9 201 533 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 6 February 1992 cited in the application see abstract	1, 20-22, 33
Y	WO, A, 9 015 881 (CIS BIO INTERNATIONAL) 27 December 1990 see page 10, line 25 - line 35; claims	2-5, 9-11
	-/--	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 May 1993 (26.05.93)

Date of mailing of the international search report

15 July 1993 (15.07.93)

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office

Authorized officer:

Facsimile No

Telephone No

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 93/00254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N.
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH volume 18, No 22, 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6733-6734 K. HENCO ET AL. "Quantitative PCR: the determination of template copy numbers by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)" cited in the application see the whole document	6-8
Y	ANN. REV. PHYS. CHEM. volume 39, 1988 pages 291-315 J-E. HEARST " A photochemical investigation of the dynamics of the oligonucleotide hybridization" cited in the application see page 293 - page 296	12-19, 27-29
A	WO, A, 9 102 817 (CETUS CORP.) 7 March 1991 see the whole document	6-8
A	WO, A, 9 001 563 (G. CIMINO) 22 February 1990 see claims; figures	12-19, 27-29
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH volume 18, No 22, 1990, ARLINGTON; VIRGINIA, US page 6739 Y. JINNO ET AL. "Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR"	12-19, 27-29
A	EP, A, 0 381 501 (EASTMAN KODAK CO.) 8 August 1990	-
A	WO, A, 9 005 023 (MAX-PLANK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 17 May 1990 cited in the application	-

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9300254
SA 69776

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

26/05/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9102815	07-03-91	DE-A-	3927467	21-02-91
		DE-A-	4006974	12-09-91
		EP-A-	0486580	27-05-92

WO-A-9201533	06-02-92	JP-A-	4082649	16-03-92
		JP-A-	4081906	16-03-92
		EP-A-	0493616	08-07-92

WO-A-9015881	27-12-90	FR-A-	2648152	14-12-90
		FR-A-	2650839	15-02-91
		AU-A-	5838690	08-01-91
		EP-A-	0478630	08-04-92
		JP-T-	4506599	19-11-92

WO-A-9102817	07-03-91	AU-A-	6352390	03-04-91
		CA-A-	2064906	22-02-91
		EP-A-	0497784	12-08-92

WO-A-9001563	22-02-90	AU-A-	4181089	05-03-90

EP-A-0381501	08-08-90	JP-A-	3007571	14-01-91

WO-A-9005023	17-05-90	DE-U-	8813773	05-01-89
		EP-A-	0442942	28-08-91
		JP-T-	4501530	19-03-92

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12Q1/68; B65B9/04;	B29C51/00; G05D23/19	B01L7/00; B29C65/02
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12Q	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	WO,A,9 102 815 (DIAGEN INST. FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 7. März 1991 in der Anmeldung erwähnt	1-22, 27-29,33
A	siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt	23-26, 31-32
P,Y	WO,A,9 201 533 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 6. Februar 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung	1,20-22, 33
Y	WO,A,9 015 881 (CIS BIO INTERNATIONAL) 27. Dezember 1990 siehe Seite 10, Zeile 25 - Zeile 35; Ansprüche	2-5,9-11
-/--		
⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
26.MAI 1993		15. 07 93
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten MOLINA GALAN E.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH Bd. 18, Nr. 22, 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US Seiten 6733 - 6734 K. HENCO ET AL. 'Quantitative PCR: the determination of template copy numbers by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---</p>	6-8
Y	<p>ANN. REV. PHYS. CHEM. Bd. 39, 1988, Seiten 291 - 315 J. E. HEARST 'A photochemical investigation of the dynamics of the oligonucleotide hybridization' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 293 - Seite 296 ---</p>	12-19, 27-29
A	<p>WO,A,9 102 817 (CETUS CORP.) 7. März 1991 siehe das ganze Dokument ---</p>	6-8
A	<p>WO,A,9 001 563 (G. CIMINO) 22. Februar 1990 siehe Ansprüche; Abbildungen ---</p>	12-19, 27-29
A	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH Bd. 18, Nr. 22, 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US Seite 6739 Y. JINNO ET AL. 'Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR' ---</p>	12-19, 27-29
A	<p>EP,A,0 381 501 (EASTMAN KODAK CO.) 8. August 1990 ---</p>	-
A	<p>WO,A,9 005 023 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) 17. Mai 1990 in der Anmeldung erwähnt -----</p>	-

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9300254
SA 69776

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

26/05/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9102815	07-03-91	DE-A-	3927467	21-02-91
		DE-A-	4006974	12-09-91
		EP-A-	0486580	27-05-92

WO-A-9201533	06-02-92	JP-A-	4082649	16-03-92
		JP-A-	4081906	16-03-92
		EP-A-	0493616	08-07-92

WO-A-9015881	27-12-90	FR-A-	2648152	14-12-90
		FR-A-	2650839	15-02-91
		AU-A-	5838690	08-01-91
		EP-A-	0478630	08-04-92
		JP-T-	4506599	19-11-92

WO-A-9102817	07-03-91	AU-A-	6352390	03-04-91
		CA-A-	2064906	22-02-91
		EP-A-	0497784	12-08-92

WO-A-9001563	22-02-90	AU-A-	4181089	05-03-90

EP-A-0381501	08-08-90	JP-A-	3007571	14-01-91

WO-A-9005023	17-05-90	DE-U-	8813773	05-01-89
		EP-A-	0442942	28-08-91
		JP-T-	4501530	19-03-92

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82